



ANNEE 2006 THESE : 2006 – TOUT 3 – 4115

CONTRIBUTION A L'EVALUATION DE FACTEUR DE RISQUE DE TRANSMISSION D'UNE ESST LORS DE TRANSFUSION SANGUINE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Emmanuelle, Elisabeth, Annick BALME

Née, le 9 mai 1981 à AIX-EN-PROVENCE (Bouches-du-Rhône)

Directeur de thèse : Madame le Docteur Véronique GAYRARD-TROY

JURY

PRESIDENT :

M. Francis LE GAILLARD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEUR :

Mme Véronique GAYRARD-TROY

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nicole HAGEN-PICARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mme Catherine VIGUIE

Docteur Vétérinaire

REMERCIEMENTS

**Au Président de thèse, Monsieur le Professeur
Francis LE GAILLARD**

Professeur des Universités
Praticien hospitalier

Biochimie, Biologie moléculaire

Pour nous faire l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommages respectueux.

**A ma Directrice de thèse, Madame le Docteur
Véronique GAYRARD-TROY**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie de la reproduction, Endocrinologie

Pour m'avoir si bien guidée et conseillée dans la réalisation de cette thèse,
n'épargnant jamais votre temps, et pour votre gentillesse en toute circonstance.
Profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Pour avoir si amicalement accepté de participer à notre jury de thèse et pour votre large contribution à ce projet.
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Catherine VIGUIE
Docteur vétérinaire, Docteur ès sciences
Chargée de Recherches UMR 181 INRA ENVT

Pour vos conseils avisés et votre disponibilité ; sans vous, ce travail aurait été impossible.
Merci pour tout.

REMERCIEMENTS

Au laboratoire INTERVET

Au LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Pour votre contribution précieuse à la réalisation de cette thèse.

DEDICACES

A mes parents,

Pour votre amour indéfectible et votre soutien pendant mes années d'études, que ce travail soit la preuve de toute ma reconnaissance et de ma tendresse.

A Fabien, Stéphanie et Emilie,

Vous êtes essentiels à ma vie.

A mes mamies, Olga et Germaine, et à tous les membres de ma famille,

Pour votre affection et votre présence constante à mes côtés.

A tous mes amis,

En espérant vous voir le plus souvent possible en Provence, à Toulouse ou à Paris.

Au Dr Julien Guerry,

Pour m'avoir transmis la passion de votre métier.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	p17
LISTE DES ABREVIATIONS.....	p20
INTRODUCTION.....	p21
PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	p25
I/ Présentation générale de quelques ESST.....	p25
I/ 1. Les ESST animales.....	p25
I/ 1.1. La tremblante des petits ruminants.....	p25
I/ 1.2. L'encéphalopathie spongiforme bovine.....	p27
I/ 1.3. L'encéphalopathie spongiforme bovine chez les petits ruminants ?.....	p29
I/ 2. Les ESST humaines.....	p30
I/ 2.1. La maladie de Creutzfeldt-Jakob.....	p31
I/ 2.2. L'épidémie d'ESB et le nouveau variant de la MCJ.....	p32
II/ Définition et propriétés du prion.....	p34
II/ 1. Une nouvelle catégorie d'agent infectieux.....	p34
II/ 2. La protéine du prion (PrP).....	p35
II/ 2.1. Propriétés et structure de la PrP cellulaire (PrPc).....	p35
II/ 2.2. Propriétés et structure de la PrP associée à l'infection (PrPsc).....	p37
II/ 2.3. La conversion conformationnelle de PrPc en PrPsc à la base de la réplication de la PrP.....	p38
II/ 3. La notion de souches.....	p40
III/ Physiopathologie des ESST.....	p41
III/ 1. Les principales étapes du schéma physiopathologique.....	p41

III/ 2. Les différentes voies de contamination.....	p43
III/ 3. Les acteurs tissulaires et cellulaires de la physiopathologie des ESST.....	p44
III/ 3.1. Les sites d'entrée du prion dans l'organisme.....	p44
III/ 3.2. Le rôle des cellules folliculaires dendritiques (FDC) matures.....	p44
III/ 3.3. Le rôle des lymphocytes B (LB) et leurs interactions avec les FDC.....	p46
III/ 3.4. Le rôle des macrophages.....	p47
III/ 4. La phase de neuroinvasion.....	p48
III/ 5. Les mécanismes mis en jeu dans les phénomènes de neurodégénérescence.....	p49
III/ 6. Les conséquences pratiques des connaissances physiopathologiques des ESST.....	p51
IV/ La transmission des ESST par transfusion sanguine.....	p52
IV/ 1. Une hypothèse devenue réalité ?.....	p52
IV/ 2. Le sang, un tissu infectieux.....	p53
IV/ 3. Efficacité de la voie intraveineuse comme voie d'infection.....	p55
IV/ 4. Barrière d'espèce et infection asymptomatique.....	p57
IV/ 5. La susceptibilité de l'hôte exposé à l'infection.....	p60
V/ Le rôle du rein dans la clairance des protéines plasmatiques et paramètres pharmacocinétiques de la PrP.....	p61
V/ 1. Les principes généraux de l'excrétion rénale des protéines plasmatiques.....	p61
V/ 1.1. Les paramètres de l'élimination.....	p61
V/ 1.1.1. Le concept de clairance.....	p61
V/ 1.1.2. Le coefficient d'extraction.....	p61
V/ 1.2. L'excrétion rénale.....	p62
V/ 1.2.1. Rappels anatomo-physiologiques.....	p62
V/ 1.2.2. La filtration glomérulaire.....	p63
V/ 1.2.3. La sécrétion tubulaire.....	p64
V/ 1.2.4. La réabsorption tubulaire.....	p65
V/ 1.2.5. La clairance rénale.....	p65

V/ 2. Les conséquences de l'insuffisance rénale sur la clairance plasmatique des protéines.....p66

V/ 3. Le devenir de la PrP après son administration par voie intraveineuse.....p66

PARTIE 2 : REALISATIONS EXPERIMENTALES...p69

I/ Introduction.....p69

II/ Objectifs.....p69

III/ Validation des méthodes analytiques.....p70

III/ 1. Objectifs.....p70

III/ 2. Procédures expérimentales.....p70

III/ 2.1. Méthodes analytiques : dosage de la PrP par immunométrie.....p70

III/ 2.1.1. Principe du dosage.....p70

III/ 2.1.2. Produits.....p71

III/ 2.1.3. Préparation des plaques : fixation du premier anticorps.....p71

III/ 2.1.4. Dosage.....p72

III/ 2.2. Déplacement des anticorps SAF 34 libresp72

III/2.2.1. Objectif.....p72

III/ 2.2.2. Préincubation des échantillons plasmatiques avec les anticorps SAF 34 libres..... p73

III/ 2.3. Déplacement des anticorps 12F10 libres.....p73

III/ 2.3.1. Objectif..... p73

III/ 2.3.2. Dosage.....p73

III/ 2.4. Effet de l'héparine sur le dosage de la PrPc endogène dans le plasma.....p74

III/ 2.4.1. Objectif.....p74

III/ 2.4.2. Dosage.....p74

III/ 3. Résultats.....p75

III/ 3.1. Déplacement des anticorps SAF 34 libres.....p75

III/ 3.2. Déplacement des anticorps 12F10 libres.....p76

III/ 3.3. Effet de l'héparine sur le dosage de la PrPc endogène dans le plasma.....p77

IV/ Expérience 1 : Effet de l'ablation chirurgicale des reins sur la clairance plasmatique de la PrP chez la brebis.....p79

IV/ 1. Objectif.....p79

IV/ 2. Matériels et méthodes.....p79

IV/ 2.1. Animaux.....p79

IV/ 2.2. Protocole expérimental.....p79

IV/ 2.3. Procédure expérimentale.....p81

IV/ 2.3.1. Anesthésie.....p81

IV/ 2.3.2 Néphrectomie.....p81

IV/ 2.3.3. Prélèvements sanguins.....p82

IV/ 2.3.4. Prélèvements urinaires.....p82

IV/ 2.3.5. Préparation de la solution de PrP.....p83

IV/ 2.3.6. Dosage de la PrPrec.....p83

IV/ 2.4. Analyse pharmacocinétique des données plasmatiques.....p83

IV/ 3. Résultats.....p85

IV/ 3.1. Evaluation de l'effet de la néphrectomie sur les paramètres pharmacocinétiques de la PrP et calcul du coefficient d'extraction de la PrP par les reins, chez des brebis non anesthésiées pendant la période contrôle.....p85

IV/ 3.2. Evaluation de l'effet d'une anesthésie sur le devenir de la PrP administrée par voie IV.....p87

IV/ 3.3. Evaluation de l'effet de la néphrectomie sur les paramètres pharmacocinétiques de la PrP et calcul du coefficient d'extraction de la PrP par les reins, chez une brebis anesthésiée pendant la période contrôle.....p89

V/ Expérience 2 : Effet d'une insuffisance rénale expérimentalement induite sur la concentration plasmatique de la protéine endogène PrPc chez le chien.....p91

V/ 1.Objectif.....p91

V/ 2. Matériel et méthodes.....p92

V/ 2.1. Animaux.....p92

V/ 2.1.1. Caractéristiques.....p92

V/ 2.1.2. Hébergement.....p93

V/ 2.2. Procédure expérimentale.....p93

V/ 2.2.1. Lésions rénales.....p93

V/ 2.2.2. Prélèvements sanguins.....p94

V/ 2.2.3. Evaluation de la fonction rénale.....p94

V/ 2.2.4. Détermination de la PrPc.....p94

VI/ 2.3. Récapitulatif : paramètres de population et calendriers des prélèvements réalisés.....	p95
---	-----

VI/ 2.3.1 Mesures des clairances plasmatiques de la créatinine et de l'exoiohexol.....	p95
--	-----

VI/ 2.3.2 Dosages de la créatinine plasmatique.....	p95
---	-----

VI/ 2.3.3. Détermination de la PrPc après la chirurgie.....	p96
---	-----

VI/ 2.4. Analyse statistique.....	p96
-----------------------------------	-----

VI/ 3. Résultats.....p96

VI/ 3.1. Conséquences de la chirurgie sur la fonction rénale.....	p96
---	-----

VI/ 3.1.1. Mesures de clairance plasmatique de la créatinine et de l'exoiohexol.....	p96
--	-----

VI/ 3.1.2. Dosages de la créatinine plasmatique.....	p98
--	-----

VI/ 3.2. Effets de l'insuffisance rénale sur les concentrations en PrPc plasmatique.....	p99
--	-----

VII/ Expérience 3 : Effet d'une insuffisance rénale spontanée sur la concentration plasmatique de la protéine endogène PrPc chez le chien.....p100

VII/ 1. Objectif.....p100

VII/ 2. Matériel et méthodes.....p100

VI/ 2.1. Animaux.....	p100
-----------------------	------

VI/ 2.2. Récapitulatif : paramètres de population.....	p101
--	------

VI/ 2.3. Protocole expérimental.....	p101
--------------------------------------	------

VI/ 2.4. Procédure expérimentale.....	p102
---------------------------------------	------

VI/ 2.4.1. Prélèvements sanguins.....	p102
---------------------------------------	------

VI/ 2.4.2. Dosages.....	p102
-------------------------	------

VI/ 2.5. Analyse statistique.....	p102
-----------------------------------	------

VII/ 3. Résultats.....p103

VI/ 3.1. Evolution des concentrations plasmatiques en créatinine chez des chiens insuffisants rénaux.....	p103
---	------

VI/ 3.2. Evaluation des conséquences d'une insuffisance rénale sur les concentrations plasmatiques en protéine endogène PrPc.....	p103
---	------

VIII/ Discussion.....p105

CONCLUSION.....p113

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....p115

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Dynamique de l'épidémie d'ESB en Grande-Bretagne. (p 28)

Figure 2 : Représentation schématique des caractéristiques biochimiques de la protéine prion humaine. (p 36)

Figure 3 : Structures tridimensionnelles de la PrPc et de la PrPsc obtenues par résonance magnétique nucléaire. (p 38)

Figure 4 : Les deux modèles de conversion conformationnelle de la PrPc en PrPsc. (p 39)

Figure 5 : Les voies de propagation du prion vers le système nerveux central (SNC) après une contamination périphérique – exemple chez l'Homme. (p 42)

Figure 6 : Acteurs cellulaires participant à la propagation du prion de la lumière du tube digestif au système nerveux entérique (ENS) après une contamination par voie orale. (p 45)

Figure 7 : Le rôle des lymphocytes B et leurs interactions avec les cellules folliculaires dendritiques. (p 47)

Figure 8 : Les étapes de la neurodégénérescence après l'injection de la PrPsc. (p51)

Figure 9 : Voies d'invasion du SNC par le prion après son ingestion. (p 54)

Figure 10 : Evolution temporelle du nombre de bovins atteints d'ESB entrant dans la chaîne alimentaire humaine et, consécutivement, du nombre de nouveaux cas de nvMCJ. (p 59)

Figure 11 : Schéma de l'ultrastructure du filtre glomérulaire et de ses principales caractéristiques de filtration. (p 64)

Figure 12 : Représentation schématique de la protéine prion recombinante ovine. (p 71)

Figure 13 : Représentation graphique de l'évolution des valeurs de DO (moyenne \pm ET) en fonction du log des concentrations en anticorps libres SAF 34 préincubés avec les échantillons. (p 75)

Figure 14 : Représentation graphique de l'évolution des valeurs de DO (moyenne \pm ET) en fonction du log des concentrations en anticorps 12F10 libres. (p76)

Figure 15 : Représentation graphique de la corrélation linéaire entre les valeurs des concentrations en PrPc mesurées dans du plasma hépariné et celles des concentrations mesurées dans du plasma prélevé sur EDTA. (p 77)

Figure 16 : Représentation graphique des valeurs des DO mesurées dans un milieu tampon hépariné et dans un milieu tampon-EDTA en fonction des concentrations en PrPrec (ng/ml). (p 78)

Figure 17 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec, à la dose de 0.02 mg/kg, à deux brebis avant (contrôle sans anesthésie) et après une néphrectomie. (p 86)

Figure 18 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis avant et après anesthésie. (p 88)

Figure 19 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis anesthésiée avant et après une néphrectomie. (p 90)

Figure 20 : Représentation graphique des valeurs de clairance plasmatique de la créatinine et de l'exoiohexol (ml/kg/min) (moyenne \pm ET) chez la population expérimentale avant et après la chirurgie rénale. (p 97)

Figure 21 : Représentation graphique des valeurs de créatininémie (μ M) (moyenne \pm ET) chez 16 chiens avant et après la chirurgie rénale. (p 98)

Figure 22 : Evolution temporelle des concentrations en PrPc plasmatique (ng/ml) chez les 16 chiens insuffisants rénaux et valeur basale de cette concentration chez les chiens contrôles (moyenne \pm ET). (p 99)

Figure 23 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs de créatininémie ($\mu\text{mol/L}$) et celles de la concentration plasmatique en PrPc (ng/ml) chez les 2 populations de chiens (contrôle et insuffisants rénaux). (p 104)

Photo 1 : Aspect d'une « plaque floride » en microscopie optique chez un patient atteint du nvMCJ. (p 33)

Photo 2 : Vacuolisation des neurones et du neuropile chez une brebis atteinte de tremblante. (p 49)

Photo 3 : Gliose astrocytaire. (p 50)

Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine administrée par voie IV, à la dose de 0.02 mg/kg, à deux brebis au cours de la période contrôle (sans anesthésie) et après une néphrectomie (brebis maintenues anesthésiées). (p 87)

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine administrée par voie IV, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis avec et sans anesthésie. (p 89)

Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine administrée par voie IV, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis avant (contrôle avec anesthésie) et après une néphrectomie. (p 91)

LISTE DES ABREVIATIONS

- Ac = Anticorps
- AchE = Acétylcholinestérase E
- ATNC = Agent Transmissible Non Conventionnel
- Cl = Clairance
- DFG = Débit de Filtration Glomérulaire
- DO = Densité Optique
- ESB = Encéphalopathie Spongiforme Bovine
- ESF = Encéphalopathie Spongiforme Féline
- ESV = Encéphalopathie Spongiforme du Vison
- ESST = Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles
- FDC = Cellules Folliculaires Dendritiques
- GALT = Tissu Lymphoïde Associé à l'Intestin
- GSS = Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker
- IFF = Insomnie Fatale Familiale
- IR = Insuffisance Rénale

- IV = Intraveineuse
- kDa = Kilodaltons
- LB = Lymphocytes B
- MCJ = Maladie de Creutzfeldt-Jakob
- MRT = Temps Moyen de Résidence
- nvMCJ = nouveau variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob
- PrP = Protéine du Prion
- PrPc = Protéine du Prion Cellulaire
- PrPrec = Protéine du Prion Recombinante
- PrPres = Protéine du Prion Résistante à la digestion protéolytique
- PrPsc = Protéine du Prion « scrapie », isoforme pathologique de la PrP
- SNA = Système Nerveux Autonome
- SNC et SNP = Système Nerveux Central et Système Nerveux Périphérique
- TFG = Taux de Filtration Glomérulaire
- TNF α = *Tumor Necrosis Factor α*
- VSS = Volume de distribution à l'équilibre

INTRODUCTION

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) forment une catégorie de maladies humaines et animales connues depuis longtemps. Ainsi, la tremblante du mouton a-t-elle été décrite pour la première fois en 1732 et la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'Homme en 1920. Cependant, la création récente de ce groupe nosologique, la mise en évidence d'une étiopathogénie complexe ainsi que l'émergence de nouvelles entités cliniques d'importance capitale pour la santé publique, ont fait des ESST un domaine de recherche scientifique aujourd'hui en plein essor.

A l'heure actuelle, quatre maladies humaines et cinq maladies animales sont répertoriées: chez l'Homme, le Kuru, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) et l'insomnie fatale familiale (IFF), et chez l'animal, la tremblante des ovins et des caprins, la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), l'encéphalopathie spongiforme du vison (ESV) et l'encéphalopathie spongiforme féline (ESF). En terme de prévalence, les ESST restent relativement rares.

Après avoir constitué une véritable énigme par rapport aux connaissances scientifiques des microorganismes pendant plusieurs années, les agents responsables des ESST continuent encore à susciter des questions, notamment en ce qui concerne leur nature exacte. Ces agents transmissibles non conventionnels (ATNC) ou prions - terme que l'on doit à Prusiner pour « particules **protéiques infectieuses**» (Prusiner, 1982) - seraient constitués de la forme anormale d'une protéine endogène. Cette protéine pourrait adopter au moins deux conformations spatiales : une conformation cellulaire « saine » (PrP^c), présente de façon ubiquitaire dans l'organisme, et une conformation pathogène (PrP^{Sc}) à laquelle l'infectiosité est associée (Prusiner, 1998). Prusiner et son équipe ont récemment apporté la preuve de la nature exclusivement protéique du prion (Legname, 2004).

Les ESST sont longtemps restées méconnues du grand public. Cependant, l'apparition à partir de 1985 de cas de MCJ liés à l'administration de l'hormone de croissance extraite d'hypophyses humaines contaminées, prélevées sur des cadavres, a causé les premières inquiétudes. Mais plus encore, le développement de l'épizootie de l'ESB au Royaume-Uni et la suspicion de sa transmission à l'homme par voie alimentaire après la description du nouveau variant de la MCJ (nvMCJ) (Will, 1996), ont attiré l'attention de l'opinion publique sur ces maladies neurodégénératives toujours mortelles. La crise de l'ESB a fortement ébranlé la confiance du consommateur à l'égard de l'innocuité des denrées animales, entraînant dans plusieurs pays l'introduction d'un vaste dispositif réglementaire en matière de sécurité sanitaire des aliments.

Le nombre de cas du nvMCJ semble cependant plus limité que ce qui avait été annoncé, et l'ESB recule sensiblement au Royaume-Uni ainsi que dans d'autres pays européens. En 2006, l'heure n'est pourtant pas à l'apaisement, que ce soit en médecine vétérinaire ou en médecine humaine. En effet, récemment, la confirmation du premier cas naturel d'ESB chez une chèvre laisse redouter la transmission possible de la souche d'origine bovine aux petits ruminants (Eloit, 2005). Par ailleurs, deux patients britanniques pourraient avoir été infectés par l'agent responsable du nvMCJ suite à une transfusion de sang contaminé (Llewelyn, 2004 ; Peden, 2004). L'hypothèse d'une telle contamination par voie sanguine a été confirmée

expérimentalement. En effet, la voie intraveineuse transmet efficacement l'agent responsable du nvMCJ chez les moutons (Houston, 2002) et les primates (Herzog, 2004).

Le risque de la transmission iatrogène à l'Homme du nvMCJ par la transfusion de sang a donné une nouvelle dimension à cette maladie. Notre étude s'inscrit dans l'analyse de ce risque. De façon générale, pour être capable d'évaluer le risque de transmission d'une ESST, il est nécessaire de prendre en compte un certain nombre de facteurs : la souche pathogène, l'identification des matériaux à risque et la détermination de leur taux d'infectiosité, la barrière d'espèce, la voie de contamination, l'exposition de l'organisme à l'agent infectieux et la sensibilité de l'hôte exposé.

L'exposition de l'organisme à la protéine du prion, après son introduction par voie sanguine, dépend du titre infectieux du sang du donneur et de la capacité de l'organisme à éliminer plus ou moins rapidement cette protéine, c'est-à-dire, de sa clairance. Un travail de thèse présenté en 2004 suggère que le rein constitue l'un des sites d'élimination de la protéine (Ithurrealde, 2004).

Notre étude a deux principaux objectifs :

- la mise en évidence du rôle du rein dans la clairance plasmatique de la protéine du prion ;
- l'évaluation de l'incidence de l'insuffisance rénale (IR) sur l'élimination de la protéine et sa caractérisation en tant que facteur de risque.

Notre exposé se découpera en deux parties. Dans un premier temps, nous rappellerons les grandes lignes des connaissances actuelles sur les principales ESST et leur étiologie. Nous nous intéresserons ensuite à la physiopathologie de ces maladies afin d'évaluer le risque de leur transmission iatrogène, en particulier par voie hématogène. Puis, nous dresserons le bilan des acquis scientifiques sur le risque de transmission des ESST par transfusion sanguine. Enfin, nous envisagerons les paramètres pharmacocinétiques de la protéine du prion et les mécanismes rénaux d'élimination des protéines.

Dans une deuxième partie, nous présenterons les résultats de nos études réalisées à partir de deux modèles animaux. Des expériences faites sur des brebis

néphrectomisées nous permettront d'évaluer la participation du rein dans l'élimination de la protéine du prion recombinante administrée par voie sanguine ; cette protéine recombinante ovine sera utilisée comme modèle de la protéine pathologique. Par ailleurs, des atteintes rénales expérimentales et spontanées constatées sur des chiens nous aideront à vérifier si l'insuffisance rénale, en limitant l'élimination de la protéine, influence le niveau d'exposition de l'organisme à la protéine du prion.

PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I/ Présentation générale de quelques ESST

Les ESST sont des maladies neurodégénératives et transmissibles qui présentent des caractéristiques communes. Elles débutent par une phase asymptomatique qui est très longue au regard de la durée de vie de l'espèce considérée ; elles se traduisent ensuite par des signes cliniques qui sont le reflet exclusif de l'atteinte nerveuse centrale. L'évolution est lente (plusieurs semaines à plusieurs mois), progressive et inexorablement fatale. Les lésions tissulaires sont exclusivement confinées au système nerveux central: classiquement, elles comportent une perte neuronale, une dégénérescence spongiforme des neurones et du neuropile, et une gliose astrocytaire. En revanche, ni réponse immunitaire ni réponse inflammatoire systémique n'interviennent. On ne dispose actuellement d'aucun traitement contre ces affections.

I/ 1. Les ESST animales

I/ 1. 1. La tremblante des petits ruminants

La tremblante des ovins et des caprins fut la première maladie identifiée du groupe des ESST. Cette maladie enzootique est de répartition mondiale, et dans certains troupeaux, elle atteint jusqu'à 30% des animaux (une fréquence inférieure à 5% est considérée comme plus courante) (Detwiler, 2003).

Elle n'est pas considérée comme une zoonose. Cependant, le risque représenté par les ESST des petits ruminants pour l'homme a été reconsidéré suite à l'apparition de l'ESB et à sa transmission expérimentale aux ovins et aux caprins par voie orale (Foster, 1993). Pour réduire le risque d'une hypothétique transmission à l'homme d'une ESST par l'intermédiaire de la consommation de tissus d'origine ovine et caprine, la tremblante des petits ruminants est à déclaration obligatoire en France depuis 1996, et des mesures prophylactiques ont été prises, comme l'interdiction des farines de viande et d'os dans l'alimentation de ces animaux depuis 1994.

Les critères de suspicion clinique sont les modifications du comportement, les troubles locomoteurs (ataxie), le prurit et les mouvements anormaux (tremblements traduisant une hyperesthésie). Ces symptômes, principalement observés sur des animaux âgés de 1 à 5 ans, sont associés de façon diverse et plus ou moins intense en fonction du stade évolutif. L'évolution, qui se fait sur plusieurs semaines à plusieurs mois, est progressive, avec une aggravation des symptômes au cours du temps.

Ce sont Cuillé et Chelle, professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, qui, en 1936, montrèrent les premiers le caractère transmissible et la nature infectieuse de l'agent pathogène responsable de la tremblante (Cuillé et Chelle, 1936). A la différence des autres ESST, la transmission horizontale interindividuelle de l'agent de la tremblante ne fait aucun doute dans l'espèce ovine (Ryder, 2004), même si ses modalités restent encore largement imprécises. Par ailleurs, la transmission de l'infection par des ovins en phase préclinique est fréquemment suggérée pour expliquer l'apparition de la tremblante dans des troupeaux considérés comme indemnes. Notons que la réceptivité et la sensibilité des ovins à la tremblante sont largement déterminées par des facteurs génétiques (Elsen, 1999).

Des titres infectieux relativement importants sont retrouvés dans plusieurs organes périphériques des ovins atteints de tremblante, contrairement à ce qui est observé chez l'homme ou le bovin, ce qui pourrait expliquer le caractère endémique de la maladie chez les ovins (Race, 1998 ; Jeffrey, 2001).

Par ailleurs, le placenta et les annexes fœtales sont considérés à l'heure actuelle comme la source de contamination majeure (Pattison, 1974). Les sécrétions non génitales (urine, salive, fèces) se sont toutes montrées non infectantes.

Plusieurs modalités sont évoquées pour expliquer l'infection d'un individu à partir d'enveloppes fœtales. Tout d'abord, l'agneau peut se contaminer lors de la tétée ou du léchage, car le placenta et les eaux fœtales souillent abondamment la mamelle à la mise-bas. En outre, les enveloppes peuvent être ingérées par une brebis voisine et la contaminer ; or l'infectiosité ne serait pas modifiée par le passage digestif et pourrait se retrouver dans les fèces, ce qui permettrait une dissémination de l'agent infectieux dans l'environnement. De ce fait, cette large contamination,

associée à l'extraordinaire résistance des prions aux agents physiques et chimiques, suggère le rôle majeur de l'environnement dans la transmission de l'agent pathogène, par consommation de végétaux souillés (Race, 1998). La contamination des agneaux *in utero* n'a jamais été démontrée de façon formelle (Andréoletti, 2002 ; Elsen, 1999).

I/ 1. 2. L'encéphalopathie spongiforme bovine

L'ESB est identifiée pour la première en Grande-Bretagne en 1986 (Wilesmith, 1991). Le nombre de cas cliniques n'a cessé d'augmenter jusqu'en 1993 dans ce pays, avant que ne se fassent sentir les effets des mesures de lutte. Près de 182 000 cas ont été diagnostiqués à ce jour sur un cheptel de 12,9 millions de têtes. Les pays européens les plus touchés en dehors de la Grande-Bretagne sont l'Irlande, le Portugal, la Suisse et la France (982 cas confirmés en France au 18 septembre 2006 pour un cheptel de 20 millions de têtes) (Afssa, 2006).

Actuellement, la baisse de l'épizootie se confirme en Europe. En France, deux cas seulement ont été diagnostiqués au cours des six premiers mois de l'année 2006, au lieu de 31 en 2005, 54 en 2004 et 137 en 2003 (Guillet, 2006).

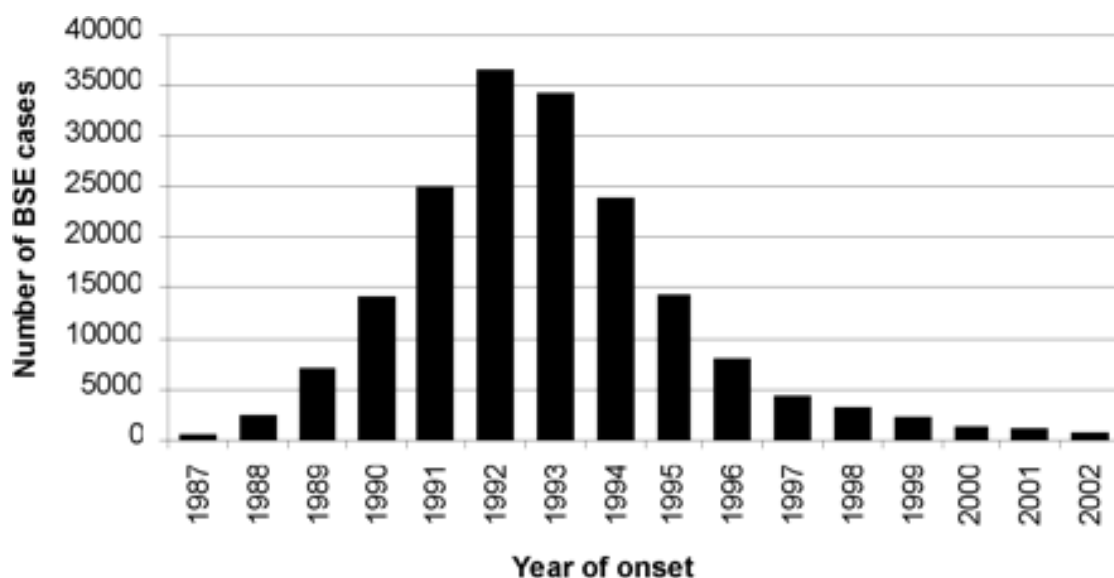


Fig. 1 : Dynamique de l'épidémie d'ESB en Grande-Bretagne. Nombre de bovins atteints d'ESB en Grande-Bretagne, recensés par année depuis le début de l'épidémie. (SMITH, P.G., BRADLEY, G., BSE and its epidemiology, *Br Med Bull.*, 2003, **66**, 185-198).

L'émergence de cette maladie pourrait être expliquée par l'adjonction dans l'alimentation des bovins de farines animales insuffisamment chauffées, obtenues à partir de carcasses de moutons et de vaches (Wilesmith, 1991). Cependant, l'origine exacte de la souche d'ESB n'est pas connue. Une des hypothèses est celle du recyclage d'un agent ovin responsable de tremblante naturelle (Hope, 1999 ; Scott, 1999), suite aux modifications des procédés de fabrication des farines de viandes et d'os. Remarquons que des études épidémiologiques multiples n'ont jamais montré de lien entre la tremblante et l'ESB (Wilesmith, 1991).

Une deuxième hypothèse évoque l'apparition d'un ou quelques cas spontanés d'ESB; les animaux infectés auraient été recyclés dans les farines animales, propageant ainsi l'infection. Quoi qu'il en soit, l'interdiction d'incorporer des farines dans l'alimentation des bovins a entraîné une réduction de l'incidence de la maladie (Prince, 2003).

Des cas de transmission naturelle de l'ESB par l'alimentation à des chats, à des félidés sauvages, à des visons et à des ruminants de zoo ont été observés. Ovins et caprins sont également sensibles à cette maladie (Foster, 1993). Par ailleurs, une relation entre l'ESB et l'apparition chez l'Homme du nvMCJ, suspectée dès 1996 en Grande-Bretagne, est maintenant établie (Collinge, 1996 ; Hill, 1997 ; Scott, 1999). Ces différents aspects justifient l'inscription en France de l'ESB dans la liste des maladies légalement réputées contagieuses.

Les bovins atteints sont des sujets adultes car la période d'incubation est longue (3 à 5 ans en moyenne). L'ESB débute par des troubles du comportement, puis des symptômes d'hyperexcitabilité se développent peu à peu, l'animal réagissant de manière exagérée à des stimuli normaux. Le bovin peut présenter du prurit. Des symptômes locomoteurs s'ajoutent aux précédents : ataxie, boiteries, allures anormales. L'état général est progressivement altéré et la maladie aboutit systématiquement à la mort en 15 jours à 6 mois, après évolution graduelle des symptômes, sans phase de rémission.

Aucune prédisposition génétique, de race ou de lignée n'a été démontrée pour l'ESB à ce jour, contrairement à la tremblante chez le mouton et à la MCJ chez l'Homme.

La transmission de cette maladie s'est faite essentiellement par l'utilisation de farines de viandes et d'os dans la fabrication d'aliments du bétail (Wilesmith, 1991). En revanche, la transmission de la mère au jeune semble rare chez les bovins. Le placenta des animaux exprimant des signes cliniques d'ESB ne présente pas de caractère infectieux (Wrathall, 1997). Par ailleurs, il n'existe actuellement pas de preuve d'un passage horizontal direct du prion entre individus ou indirect par les pâturages. Notons qu'aucune infectiosité n'a pu être détectée dans les sécrétions des animaux (lait, urine, salive, fèces) (Prince, 2003).

I/ 1. 3. L'encéphalopathie spongiforme bovine chez les petits ruminants ?

Un cas naturel d'ESB découvert chez une chèvre en France en 2005 a ravivé les inquiétudes concernant la possible transmission de la souche bovine aux petits ruminants (Eloit, 2005). En 1993, Foster et son équipe ont démontré la sensibilité des ovins et des caprins à l'agent de l'ESB, y compris après une contamination alimentaire (Foster, 1993), mais jusqu'à maintenant, la maladie n'avait jamais été diagnostiquée chez ces animaux dans des conditions naturelles.

Si ces premières observations confirment que l'agent pathogène peut réellement franchir la barrière d'espèce et contaminer les petits ruminants de manière naturelle, en particulier par voie orale, les conséquences pour la santé humaine et animale seraient importantes.

En effet, il serait alors tout à fait envisageable que les farines animales aient pu constituer, comme pour les bovins, un vecteur important de l'ESB chez les petits ruminants. Par ailleurs, les signes cliniques observés chez des moutons atteints de tremblante naturelle ou d'ESB expérimentale sont similaires, ce qui laisse craindre que des erreurs de diagnostic aient conduit à la confusion de ces deux maladies. Enfin, des études épidémiologiques seraient indispensables pour caractériser le risque de transmission interindividuelle de l'agent dans les troupeaux.

Les conséquences de telles hypothèses ne sont malheureusement pas circonscrites à la sphère animale, puisque la souche d'origine bovine est pathogène pour l'Homme. Or, les recherches ont montré que la distribution tissulaire de l'infectiosité est beaucoup plus large chez les ovins atteints d'ESB expérimentale que chez les bovins (Foster, 1996 ; Jeffrey, 2001), ce qui poserait de graves problèmes en terme de sécurité alimentaire si des ovins atteints d'ESB étaient découverts. Cette

distribution concerne le système nerveux central (SNC), une grande partie de l'intestin, les organes lymphoïdes, ainsi que d'autres organes tels que le foie et le pancréas.

Notons enfin que, tout récemment, la PrPsc a été mise en évidence dans les muscles de moutons génétiquement sensibles à la tremblante, suite à une contamination expérimentale par voie intracérébrale, et à une contamination naturelle par voie orale (Andréoletti, 2004).

I/ 2. Les ESST humaines

Les ESST humaines peuvent être classées en trois catégories. La forme sporadique représente l'entité majoritaire de la MCJ. En outre, une forme génétique, qui reste particulièrement rare, regroupe trois affections : la MCJ familiale, le GSS et l'IFF. Enfin, le Kuru, maladie qui a sévi au milieu du siècle sur une peuplade de Papouasie-Nouvelle Guinée, la forme iatrogénique et le nouveau variant de la MCJ sont des ESST d'origine infectieuse. Nous n'évoquerons dans ces pages que la plus fréquente de ces encéphalopathies humaines, la MCJ.

I/ 2.1. La maladie de Creutzfeldt-Jakob

La MCJ est décrite au début des années 1920 par deux neurologues allemands. C'est l'équipe de Gajdusek qui démontre la transmissibilité et le caractère infectieux de cette affection, en inoculant des chimpanzés avec des extraits de cerveau provenant de patients morts de MCJ (Gajdusek, 1977).

Jusqu'en 1996, on distingue trois formes étiologiques de cette maladie. Les formes familiales (environ 8% des cas) sont liées génétiquement ou associées à des mutations du gène Prnp codant pour la PrPc; des mutations considérées comme causales sont retrouvées chez 15% des malades.

Les formes iatrogéniques (5% des cas) sont dues à l'emploi d'extraits humains, principalement l'hormone de croissance, ou de matériel contaminés (greffe de dure-mère, de cornée ou de tympan, interventions neurochirurgicales, explorations intracérébrales).

Les formes sporadiques, de causes encore mal définies, représentent la majorité des cas. Deux hypothèses peuvent être proposées quant à l'origine des formes sporadiques humaines : il pourrait s'agir de maladies liées à une transconformation spontanée de la PrPc en PrPsc dont la probabilité est très faible au moins chez l'homme, ce qui explique la rareté de la maladie, et l'âge tardif de son apparition. Cette hypothèse est celle qui est la plus fréquemment retenue. Ou alors, une contamination par l'environnement serait à l'origine des processus aboutissant à la transconformation de la PrPc de l'individu infecté ; si tel était le cas, le patient serait exposé à l'agent par voie périphérique (Casalone, 2004). A l'heure actuelle, aucune étude n'a pu mettre en évidence la consommation d'abats, la transfusion de sang et de produits sanguins, ou les instruments chirurgicaux comme sources d'infection dans les cas sporadiques de MCJ.

Dans toutes ses formes, la maladie est constamment mortelle à court terme. Les signes principaux sont une démence rapidement évolutive avec myoclonies, ataxie, et altérations

électroencéphalographiques. Le diagnostic formel est histologique ; les lésions élémentaires associent spongiose, perte neuronale et gliose astrocytaire (Gray, 1999).

I/ 2. 2. L'épidémie d'ESB et le nouveau variant de la MCJ

Avant 1996, la MCJ avait des caractéristiques épidémiologiques considérées comme identiques à travers le monde. Ainsi, l'extrême rareté de la MCJ avant l'âge de 40 ans a permis d'être très rapidement alerté, en 1995, au Royaume-Uni, par sa survenue chez de très jeunes adultes, sans mutation du gène Prnp ni antécédent particulier. Le nouveau variant de la MCJ s'est alors ajouté à la liste des différentes entités de cette maladie humaine (Will, 1996).

La présence en abondance, chez tous les sujets, de lésions histologiques très particulières, « les plaques florides », a suggéré une origine commune à cette maladie. Par ailleurs, quelques mois après la description de ce variant, des lésions du SNC tout à fait comparables sont observées chez le macaque expérimentalement infecté par l'ESB (Lasmézas, 1996), constituant les premières indications expérimentales en faveur d'un lien entre la nouvelle maladie humaine et l'ESB.

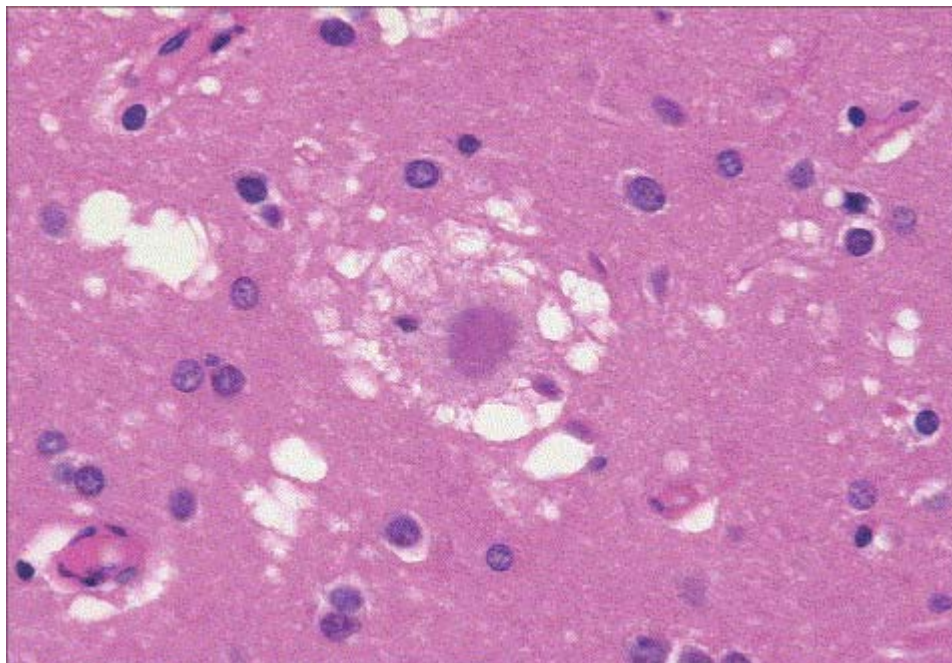


Photo 1 : Aspect d'une « plaque floride » en microscopie optique chez un patient atteint du nvMCJ: sur cette coupe d'encéphale, on observe un dépôt d'amyloïde entouré par une couronne de vacuoles. Grossissement 400. Coloration hématoxyline-éosine. (JOHNSON, R.T., Prion diseases, *Lancet Neurol.*, 2005, **4**, 635-642).

L'argument décisif pour établir l'identité de la souche de prion responsable de l'ESB et du nvMCJ résulte de la transmission à la souris de ces deux maladies et du typage lésionnel (Collinge,

1996 ; Hill, 1997 ; Scott, 1999). En effet, les lésions de spongiose présentent une répartition dans le SNC et une intensité dans chacune des régions anatomiques tout à fait comparables dans les deux cas. De plus, les durées d'incubation de la maladie chez les souris sont identiques.

Ainsi, avec une quasi-certitude, on a pu relier les cas du nvMCJ avec la consommation de viande bovine provenant d'animaux atteints d'ESB, car il est très probable que la voie de contamination par l'agent infectieux soit la voie orale.

Le nvMCJ touche des sujets jeunes (29 ans en moyenne). Les premiers signes sont psychiatriques (dépression, anxiété, troubles d'allure hystérique ou psychose) ou sensitifs (diesthésies, paresthésies). La durée d'évolution est longue, de 8 à 15 mois en moyenne.

La présence de l'isoforme anormale de la PrP anormale dans les formations lymphoïdes de tous les patients atteints du nvMCJ (Bruce, 2001), alors qu'elle est rarement détectable dans ces tissus au cours des formes habituelles de MCJ, indique que la distribution de l'infectiosité est beaucoup plus large dans le nvMCJ que dans les cas sporadiques et familiaux (Glatzel, 2003).

Le diagnostic est assuré par des biopsies amygdaliennes et cérébrales qui montrent des dépôts de PrP^{sc} très structurés régulièrement entourés d'images de vacuolisation.

Au 30 août 2006, 162 cas humains de MCJ dus à la consommation de viande contaminée ont été recensés au Royaume-Uni, et 20 cas en France. Tous les patients atteints cliniquement par cette maladie sont homozygotes pour la méthionine au codon 129 du gène de la PrP; le génotype à ce codon semble être un facteur génétique majeur de risque. Cependant, une infection asymptomatique a également été détectée chez un individu hétérozygote méthionine-valine pour ce locus (Peden, 2004). De plus, tout récemment, des chercheurs ont mis en évidence le portage asymptomatique de l'agent infectieux chez des homozygotes valine-valine (Ironsides, 2006).

II/ Définition et propriétés du prion

II/ 1. Une nouvelle catégorie d'agent infectieux

Les ATNC ou prions sont les agents responsables des ESST humaines et animales. Ce sont des particules infectieuses de nature protéique dépourvues d'acide nucléique, qui présentent donc des mécanismes de transfert et de propagation d'informations nouvelles (Prusiner, 1982).

Le prion se compose essentiellement d'une protéine, la PrP, qui possède la particularité de pouvoir adopter plusieurs conformations spatiales. Sous une forme anormale, elle est le constituant

majeur et très probablement unique de la particule infectieuse ; elle est nommée PrP^{sc} (pour **s**crapie) ou PrP^{res} (pour **r**ésistante à la digestion protéolytique). Elle est le marqueur spécifique des maladies à prions.

De plus, la PrP est synthétisée sous une forme physiologique par tous les mammifères et elle est exprimée par de nombreuses cellules de l'organisme ; on la désigne alors PrP^c (pour **c**ellulaire).

Bien que largement adoptée par la communauté scientifique, la théorie du prion n'a jamais été formellement démontrée. Cependant, il semble bien que Prusiner et son équipe aient récemment apporté la preuve de la nature exclusivement protéique du prion, en utilisant une bactérie *Escherichia coli* modifiée génétiquement (Legname, 2004).

II/ 2. La protéine du prion (PrP)

II/ 2. 1. Propriétés et structure de la PrP cellulaire (PrP^c)

La PrP est codée par un gène unique, le gène Prnp. Un polymorphisme sur le codon 129 semble associé à une sensibilité à l'infection chez l'homme. Chez le mouton, le polymorphisme sur les codons 136, 154 et 171 est aussi lié à une résistance ou une sensibilité plus importante (Elsen, 1999).

C'est une petite protéine (entre 33 et 45 kDa) dont l'extrémité -COOH présente un signal de glypiation qui entraîne l'addition d'un acide gras de type glycosphosphatidylinositol (GPI) permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique (Harris, 2003). Deux sites de glycosylation sont présents au niveau des acides aminés 181 et 197.

Elle contient 43% d'hélices α et peu de feuillets β , ce qui la distingue de son conformère pathogène et lui confère des propriétés physico-chimiques très différentes (Prusiner, 1998).

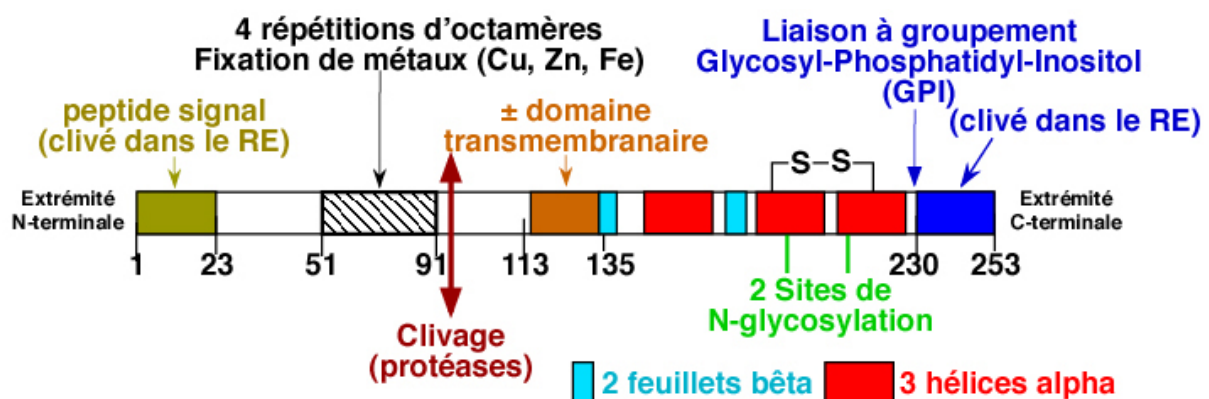


Fig. 2 : Représentation schématique des caractéristiques biochimiques de la protéine prion humaine : à l'extrémité NH₂, une séquence signal de 21 acides aminés sert à l'exportation de la protéine vers la membrane. Elle est éliminée dans la protéine mature. A l'extrémité COOH, une autre séquence est reconnue par les enzymes de glypiation. Une ancre GPI est fixée et la séquence de reconnaissance éliminée. La protéine reste ancrée dans la membrane par le GPI. Deux sites de glycosylation sont présents au niveau des acides aminés 181 et 197. Une zone comprenant 4 répétitions d'un octapeptide est également représentée. (CAU, P., (page consultée le 23 septembre 2006), Les maladies à prions : de la biologie cellulaire de la protéine vers le diagnostic et le traitement. Adresse URL : http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/PrPnor.html).

La PrPc est une molécule complexe. Par exemple, dans le cerveau humain, il existe une forme entière et deux formes tronquées, ces dernières résultant d'un clivage à des sites distincts au niveau de l'extrémité -NH₂. Ces différentes formes présentent des chaînes glycosylées en nombre et de structure variables (Pan, 2002).

Synthétisée sur les ribosomes, elle est transportée dans le réticulum endoplasmique où elle subit des modifications post-traductionnelles, et exportée via le Golgi sur la membrane où elle reste attachée par son ancre GPI. Elle n'est donc pas excrétée. Après avoir atteint la membrane, une partie de ces protéines cellulaires est endocytée par l'intermédiaire des puits recouverts d'un manteau de clathrine et clivée dans les lysosomes. *In vitro*, c'est durant son passage intracellulaire que la protéine pourrait être modifiée pour devenir PrPsc (Burthem, 2003 ; Harris, 2003).

La PrP est principalement exprimée au niveau des neurones. Les anomalies observées chez les souris dépourvues de PrPc sont mineures pour un gène qui a pourtant connu une extrême conservation évolutive, ce qui témoigne de son importance (Brandner, 2003). La PrPc est une protéine membranaire capable de transduire un signal. Elle est fortement exprimée dans les terminaisons synaptiques ; on la retrouve également associée aux vésicules synaptiques. Cependant, son rôle spécifique au niveau neuronal reste encore largement débattu ; peut-être participerait-elle au contrôle de la survie des cellules nerveuses. Il semble par ailleurs acquis que cette protéine lie le cuivre, ce qui lui conférerait une activité antioxydante ou une participation aux mouvements cellulaires du cuivre (Harris, 2003).

II/ 2. 2. Propriétés et structure de la PrP associée à l'infection (PrPsc)

La PrPsc est une glycoprotéine de poids moléculaire compris entre 28,7 et 31,1 kilodaltons (kDa), riche en glucosamine, galactose, mannose, fucose et acide neuraminique (Safar, 1990). Elle est insoluble et résistante à la plupart des procédés physico-chimiques d'inactivation (Prusiner, 1982).

La plus intéressante des propriétés de la PrPres est sa résistance partielle à la digestion enzymatique par la protéinase K : sa dégradation incomplète aboutit à la perte de l'extrémité –NH₂ et à la formation d'une PrP tronquée infectieuse de poids moléculaire compris entre 27 et 30 kDa, la PrP 27-30 (Stahl, 1991). En présence de détergents, celle-ci a la capacité à s'agréger en une structure amyloïde riche en feuillets β . Cette propriété est utilisée dans le cadre du diagnostic des ESST, puisqu'elle permet la mise en évidence des dépôts de PrPsc dans les tissus après digestion protéolytique. En outre, elle est à la base de la définition biochimique des souches de prions.

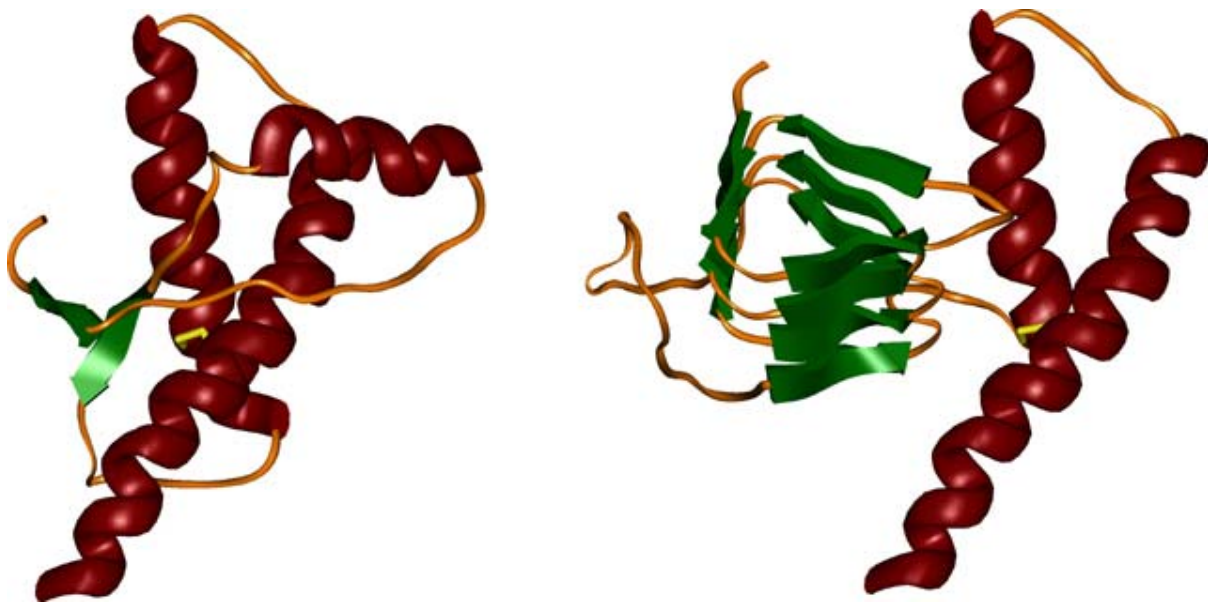


Fig. 3 : Structures tridimensionnelles de la PrPc et de la PrPsc obtenues par résonance magnétique nucléaire : (1) La PrPc comprend 3 hélices α et deux feuillets β ; (2) les hélices α sont transformées en feuillets β dans la structure de la PrPsc. (COHEN *et al.*, (page consultée le 23 septembre 2006). Adresse URL : <http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/>).

La taille de la protéine obtenue après digestion dépend de la conformation de la souche infectante (Collinge, 1996). Une différence quantitative de glycosylation permet de compléter la caractérisation de la molécule.

Notons que la biologie cellulaire de la PrPsc est encore mal connue. Il semble que de nombreuses étapes importantes pour le déclenchement du processus de conversion de PrPc en PrPsc, et pour la diffusion de l'infection dans l'organisme, aient lieu à la surface ou dans les cellules (Collins, 2004).

II/ 2. 3. La conversion conformationnelle de PrPc en PrPsc à la base de la réplication de la PrP

Selon l'hypothèse du prion, l'information déterminant les caractéristiques de l'agent pathogène réside dans des modifications post-traductionnelles spécifiques de la PrP, certainement dans des conformations spécifiques, qui peuvent être reproduites dans les molécules PrP néo-synthétisées par interaction avec la PrPsc (Prusiner, 1998). La formation de PrPsc serait donc un processus qui n'implique qu'un changement conformationnel de PrPc. Deux modèles tentent d'expliquer ce mécanisme.

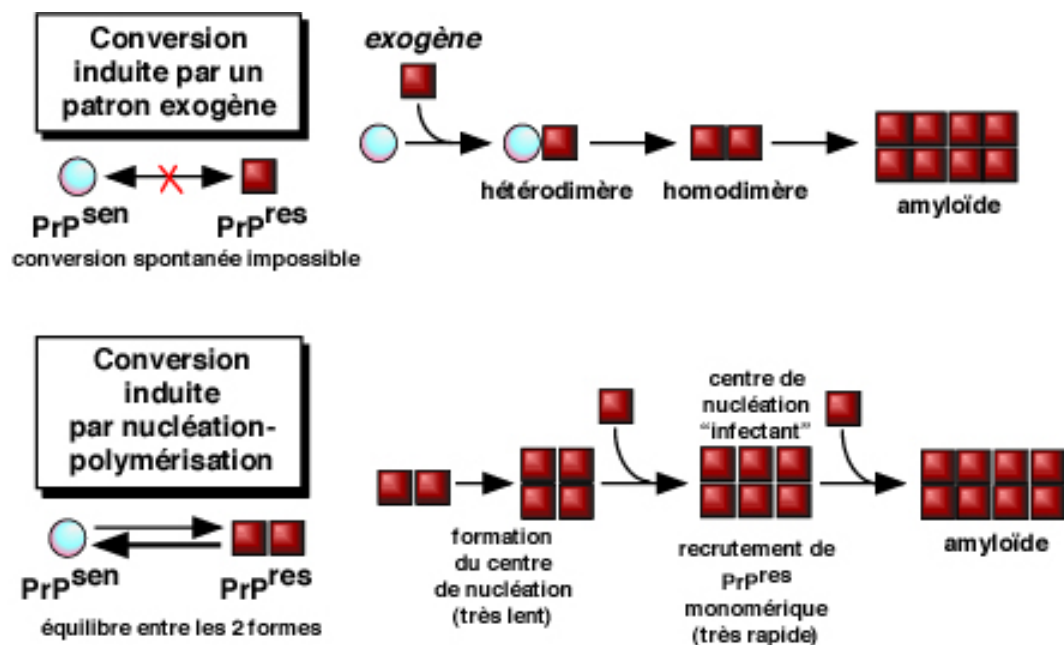


Fig. 4 : Les deux modèles de conversion conformationnelle de la PrPc en PrPsc : (1) transformation induite par un patron ; (2) nucléation-polymérisation. PrPsen = PrP sensible à la digestion par la protéinase K (= PrPc) ; PrPres = PrP résistante à la digestion par la protéinase K (= PrPsc). (AGUZZI, A., et al., *Nature Cell Biol.*, 2001, **2**, 118-25).

Le premier modèle (1) suppose qu'une protéine exogène mal conformée serve de patron, ce qui permettrait à la PrPc de se transformer en une nouvelle molécule PrPsc. Ce processus nécessiterait une dimérisation transitoire entre PrPsc et PrPc. La conversion spontanée dans le sens inverse (PrPsc en PrPc) serait rendue impossible en raison d'une barrière énergétique très élevée.

Ce modèle implique que la forme infectieuse ou PrPsc soit un monomère ou au plus un oligomère. La structure amyloïde résulterait de la mauvaise solubilité de cette forme mal repliée et serait donc secondaire au phénomène de conversion.

Le second (2) correspond au modèle de nucléation-polymérisation. Lors de sa synthèse, la protéine n'est pas encore structurée ; la PrPc est en équilibre avec une forme mal conformée, un agrégat amyloïde constitué d'oligomères de PrPsc, qui existe en petite quantité car instable. Lorsque ces formes mal conformées s'associent, un noyau se forme, ce qui les stabilise. Sur cette structure amyloïde, d'autres protéines normales viennent se transconformer ce qui aboutit à la production de larges polymères amyloïdes de PrPsc.

II/ 3. La notion de souches

Il est bien établi que les agents des ESST présentent des variations de souches. Cela a été observé il y a plus de trente ans dans deux isolats expérimentaux de tremblante, qui ont donné lieu à des signes cliniques extrêmement différents chez les chèvres, soit un syndrome de somnolence, soit un syndrome de grattage (Dickinson, 1976).

Lors de passages en séries, chaque souche pathogène produit sur une lignée de souris donnée une maladie aux caractéristiques étonnement stables ; la durée de la période d'incubation, ainsi que la répartition et l'intensité des lésions de spongiose sont parfaitement reproductibles, dès lors que l'inoculum de départ et la voie d'injection sont fixes (Lasmézas, 2003).

Il faut noter qu'il existe toujours une interaction extraordinairement étroite entre hôte et agent infectieux ; ainsi, concernant les durées d'incubation de la maladie, celles-ci sont intimement liées à la souche pathogène mais également à l'hôte, et en particulier à son statut génétique (Foster, 2001). Par ailleurs, le passage en série de prions sur des animaux génétiquement différents au locus du gène Prnp peut donner naissance à de nouvelles souches pathogènes.

Le support moléculaire de la variabilité des souches est lié à la capacité de la PrPsc d'adopter de nombreuses conformations stables transmissibles d'espèce à espèce et conduisant à des phénotypes variés (Safar, 1998).

Plus d'une vingtaine de souches de prions ovins et caprins ont ainsi été caractérisées chez les rongeurs. Cette technique a également permis à Bruce et al. de montrer que la souche unique de prions qui a contaminé l'élevage bovin britannique possède les mêmes propriétés biologiques et biochimiques que l'agent du nvMCJ, et est différente des souches connues de tremblante (Bruce, 1997). Cet agent infectieux, et ceux des encéphalopathies spongiformes féline et du vison ont aussi montré leur identité.

Remarquons cependant que des travaux récents de différentes équipes scientifiques évoquent l'existence d'autres souches de prions responsables de cas d'ESB atypiques (Casalone, 2004 ; Normile, 2004).

III/ Physiopathologie des ESST

III/ 1. Les principales étapes du schéma physiopathologique

L'acquisition d'une grande partie des connaissances sur la physiopathologie des ESST est issue de l'étude des modèles expérimentaux de tremblante chez le mouton et chez la souris. Ainsi, les scientifiques ont pu déterminer que la réplication de l'agent au niveau périphérique précède celle du système nerveux central, quelle que soit la voie d'inoculation utilisée. Depuis, de nombreuses études sur ces animaux ont précisé les données initiales.

Suite à une contamination orale par l'agent de la tremblante, la PrPsc s'accumule rapidement dans les plaques de Peyer et dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) par voie lymphatique ; le prion est ensuite détecté dans les autres tissus lymphoïdes, en particulier dans la rate qu'il atteindrait par la circulation sanguine, puis dans le système nerveux périphérique et dans le SNC (Andréoletti, 2000 ; Maignien, 1999 ; McBride, 2001).

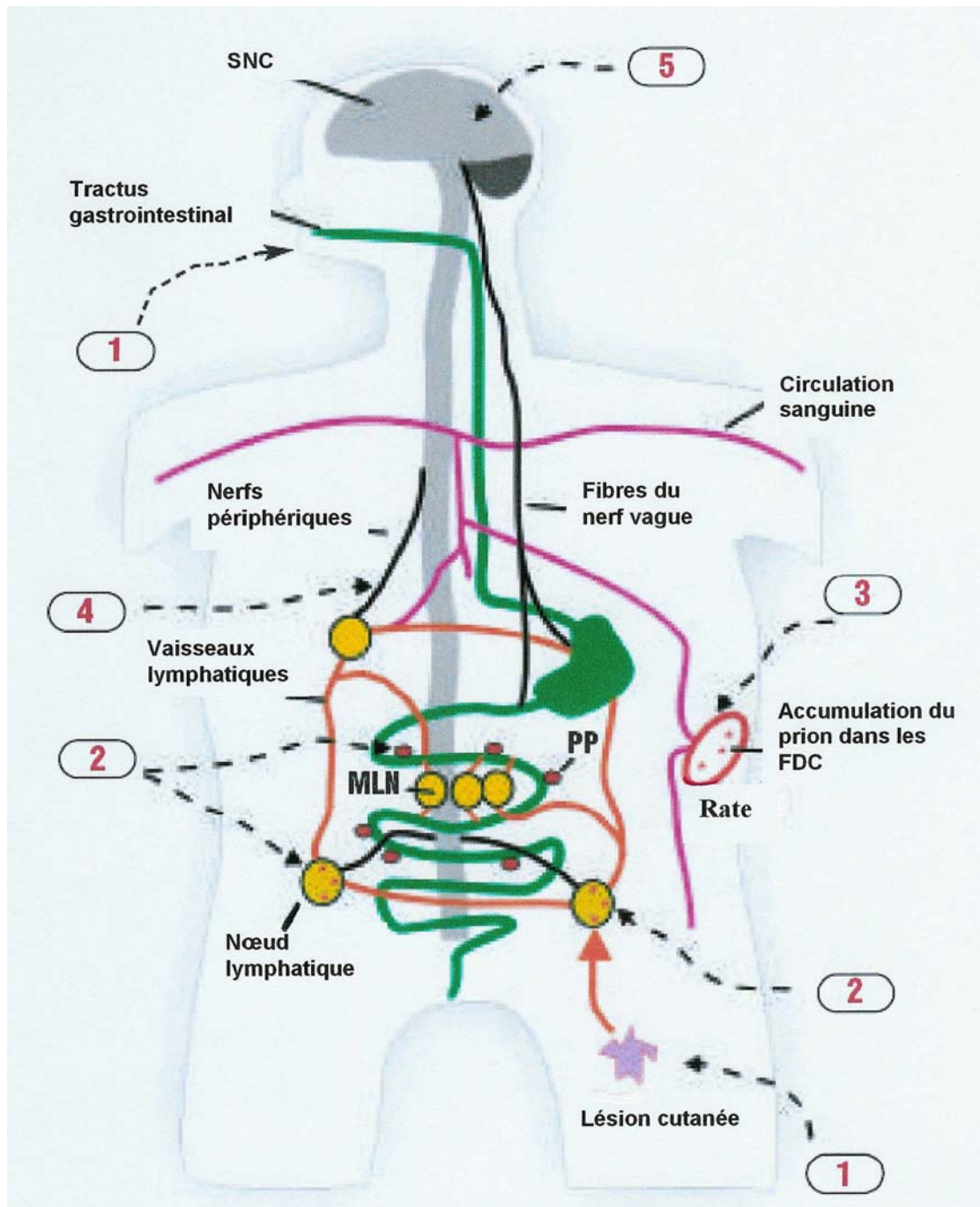


Fig. 5 : Les voies de propagation du prion vers le système nerveux central (SNC) après une contamination périphérique – exemple chez l'Homme : 1) L'infection périphérique (par voie orale (VO) ou à travers la peau lésée par exemple) est la principale voie de contamination dans les ESST naturelles. 2) Suite à une contamination, le prion s'accumule d'abord dans les cellules folliculaires dendritiques (FDC), qui sont localisées dans les centres germinatifs des tissus lymphoïdes drainant le site d'entrée du prion dans l'organisme – plaques de Peyer (PP) et nœuds lymphatiques mésentériques (MLN) suite à une infection par VO. 3) Le prion est ensuite rapidement détecté dans les autres tissus lymphoïdes, en particulier dans la rate, qu'il atteindrait par la circulation sanguine et lymphatique. 4) Après son accumulation dans les FDC, le prion infecte les nerfs sympathiques et les fibres du nerf vague, et se propage le long de ces voies vers le SNC. 5) L'accumulation du prion dans

l'encéphale provoque une neurodégénérescence, et aboutit à la mort de l'individu. (MABBOTT, N., TURN, M., Prions and the blood and the immune system, *Haematologica*, 2005, **90**, 542-548).

Cependant, ce schéma physiopathologique présente des variations en fonction de la combinaison de différents facteurs : la souche pathogène mise en jeu, le génotype de l'hôte au locus du gène Prnp, la voie de contamination et la dose infectieuse. C'est ainsi que la participation des tissus lymphoïdes dans les mécanismes pathologiques de certaines ESST est moins certaine, comme c'est le cas pour l'ESB chez les bovins où l'infection apparaît confinée au SNC, à la rétine et à l'iléon distal (Wells, 1998).

III/ 2. Les différentes voies de contamination

La méthode la plus rapide et la plus efficace pour induire une encéphalopathie spongiforme au laboratoire est l'inoculation intracérébrale d'homogénats de cerveau. Les modèles expérimentaux ont montré que l'agent pathogène est également transmissible par voies orale, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, oculaire (instillation conjonctivale, greffe cornéenne et injection intraoculaire), et consécutivement à une scarification cutanée.

Sur le terrain, l'infection périphérique est la principale voie de contamination. Si des incertitudes demeurent quand au mode de contamination dans la tremblante naturelle du mouton, l'origine alimentaire de l'ESB et du nvMCJ ne fait guère de doute ; la voie orale constitue donc une voie de contamination très efficace pour les maladies à prion d'origine bovine (Maignien, 1999). Par ailleurs, Gajdusek a montré que le kuru était contracté à l'occasion d'actes de cannibalisme (Gajdusek, 1977).

Il faut noter que la susceptibilité des individus à l'exposition au prion est variable et difficilement prévisible. Ainsi, la réceptivité et la sensibilité des ovins à la tremblante sont-elles principalement déterminées par le génotype au locus Prnp (Andréoletti, 2000 ; Elsen, 1999). Pour les bovins, on constate que les cas d'ESB ne concernent qu'une ou deux vaches dans un même troupeau, alors que les animaux le constituant ont un patrimoine génétique proche et ont reçu des quantités équivalentes de farines animales contaminées. De même, bien que de nombreuses personnes en Grande-Bretagne et en Europe aient dû ingérer l'agent infectieux, seul un petit nombre d'entre elles a jusqu'à maintenant exprimé cliniquement la maladie (Brandner, 2003).

Il existe donc très certainement des facteurs de prédisposition aux ESST (biologiques, génétiques, environnementaux) qui retardent leur apparition, voire protègent de ces infections, mais ils restent encore largement méconnus.

III/ 3. Les acteurs tissulaires et cellulaires de la physiopathologie des ESST

III/ 3. 1. Les sites d'entrée du prion dans l'organisme

A la suite d'une contamination orale, l'agent infectieux s'accumule d'abord dans les plaques de Peyer, ainsi qu'au niveau des follicules primaires et des centres germinatifs des follicules secondaires à cellules B (Andréoletti, 2000).

Les cellules M du GALT constituent les points d'accès à l'organisme des agents infectieux parvenus dans le tube digestif. Par un mécanisme de transcytose, elles conduisent le prion de la lumière intestinale jusqu'à une poche intra-épithéliale, où sont localisées les cellules clés du système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes) (Mabbott, 2001).

III/ 3. 2. Le rôle des cellules folliculaires dendritiques (FDC) matures

Les cellules folliculaires dendritiques (FDC) assureraient la réplication et l'accumulation du prion dans les organes lymphoïdes, car elles expriment de façon notable la PrP^c sur leur membrane; de plus, les études immunohistochimiques montrent que la répartition de la PrP^{sc} dans les tissus lymphoïdes se confond avec celle des FDC (Brown, K.L., 1999 ; Montrasio, 2000).

Les FDC captent les antigènes sous forme de complexes immuns. Les cellules dendritiques migrantes (DC) joueraient un rôle important au cours de cette étape, en participant à la transmission physique de la PrP^{sc} de la muqueuse intestinale aux FDC (Huang, 2002). Par ailleurs, il est possible que la PrP^{sc} soit délivrée directement aux FDC par un mécanisme de transport plasmatique mettant en jeu le complément (Burthem, 2003).

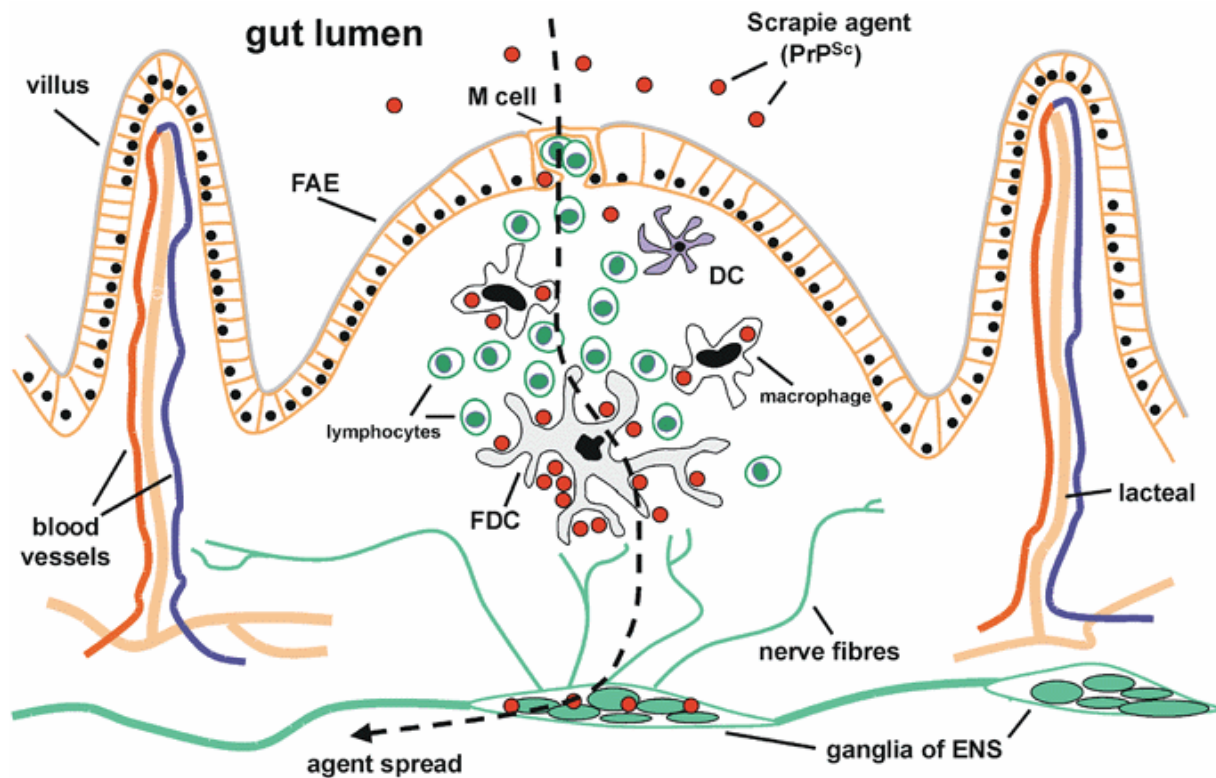


Fig. 6 : Acteurs cellulaires participant à la propagation du prion de la lumière du tube digestif au système nerveux entérique (ENS), après une contamination par voie orale. Rapidement après son ingestion, la PrP^{Sc} est détectée dans les cellules M de la muqueuse intestinale, dans les FDC des plaques de Peyer, dans les macrophages, et dans les ganglions du ENS. DC = cellules dendritiques ; FAE = épithélium associé aux formations lymphoïdes. (MABBOTT, 2001)

On sait depuis longtemps que des souches données de prion ciblent préférentiellement des sous-types de cellules neuronales. Ces différences dans le tropisme cellulaire des souches pathogènes pourraient également concerner la physiopathogénie périphérique. Certaines souches cibleraient préférentiellement des populations cellulaires dans les organes périphériques (Aguzzi, 2003 ; Brown, K.L., 1999).

Ce phénomène est important à éclaircir, car les bases moléculaires et cellulaires du tropisme de l'agent infectieux semblent directement liées au danger potentiel que pourrait représenter l'ESB chez le mouton et le nvMCJ dans le sang humain.

III/ 3. 3. Le rôle des lymphocytes B (LB) et leurs interactions avec les FDC

Les LB, exprimant ou non le gène Prnp, jouent un rôle majeur dans la physiopathologie des ESST. Une déficience innée ou acquise de la fonction B empêche l'accumulation de la PrPsc dans les tissus lymphoïdes et la phase de neuroinvasion qui s'en suit (Klein, 1998).

En effet, les LB émettent des signaux nécessaires à la maturation des FDC qui assurent la réplication du prion. La communication cellulaire entre les LB et les FDC se fait par l'intermédiaire de cytokines, en particulier par les lymphotoxines $\alpha 1/\beta 2$ et par le $TNF\alpha$ (*tumour necrosis factor α*), dont les récepteurs sont localisés sur la membrane plasmique des FDC (Aguzzi, 2003 ; Klein, 1998 ; Mabbott, 2001 ; Montrasio, 2000).

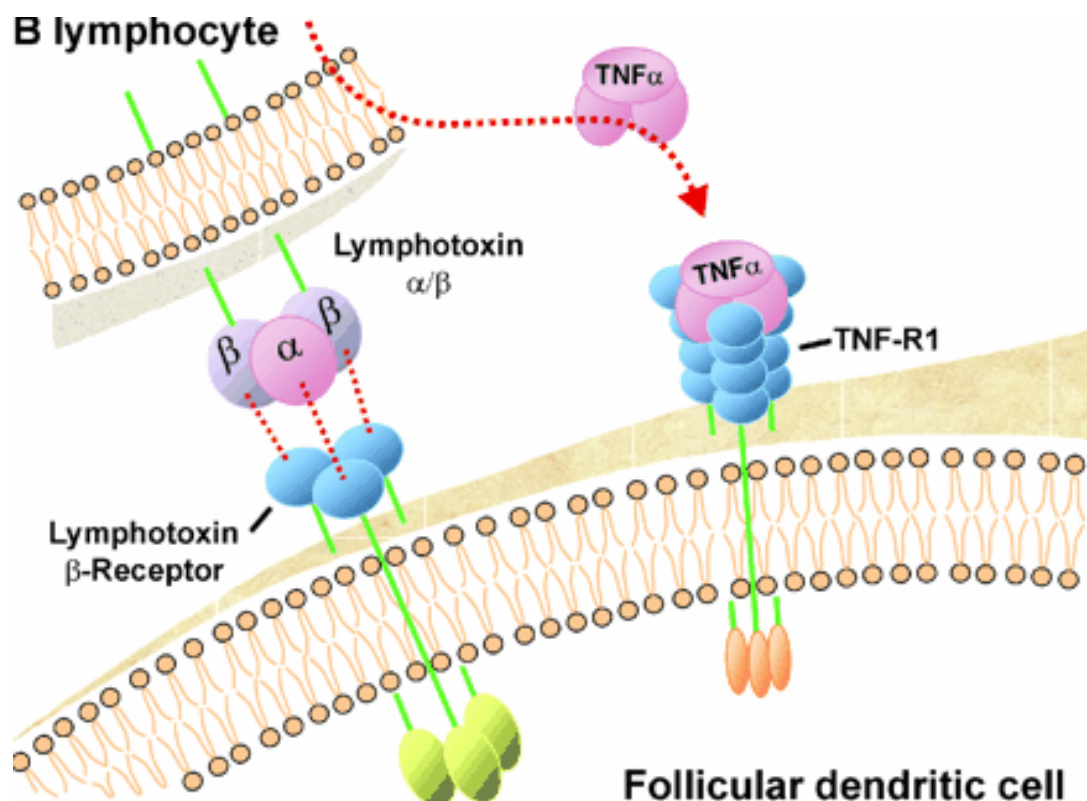


Fig. 7 : Le rôle des lymphocytes B et leurs interactions avec les cellules folliculaires dendritiques. Les cytokines synthétisées par les LB sont indispensables à la maturation des FDC. Les lymphotoxines $\alpha 1/\beta 2$ agissent uniquement par l'intermédiaire du récepteur de la lymphotoxine β , et le $TNF\alpha$ par le récepteur 1 du TNF (TNF-R1). (MABBOTT, 2001).

III/ 3. 4. Le rôle des macrophages

Des amas intralysosomaux de PrPsc ont été observés dans les macrophages spléniques chez des souris infectées par la tremblante. La disparition expérimentale de ces cellules, avant ou peu de

temps après l'infection par voie périphérique, conduit à l'augmentation de l'infectiosité dans la rate et à un raccourcissement de la période d'incubation (Mabbott, 2001).

Ainsi, les macrophages seraient capables de phagocyter le prion et de ralentir sa réplication. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la clairance du prion par ces cellules restent inconnus.

Cependant, on peut penser que les macrophages, par leur capacité de phagocytose et par leur mobilité, peuvent participer à la diffusion de l'infection dans l'organisme (Schlomchik, 2001). Cette question n'a pas encore été clairement résolue.

III/ 4. La phase de neuroinvasion

La phase de neuroinvasion se divise en deux grandes étapes : la propagation dans les tissus lymphoïdes par voies systémique et lymphatique, et la phase de neuroinvasion proprement dite.

On suspecte le rôle du système nerveux autonome (SNA) périphérique dans le transport du prion des tissus lymphoïdes vers le SNC (McBride, 2001). Ce transport nécessite l'expression par les neurones de la PrPc (Blättler, 1997), ce qui est physiologiquement le cas chez l'Homme et chez l'animal. Les tissus lymphoïdes sont principalement innervés par le SNA sympathique. Une sympathectomie retarde la propagation du prion de ces tissus vers la moelle spinale thoracique, qui constitue le site d'entrée des nerfs sympathiques dans le SNC.

Les titres infectieux retrouvés dans des rates hyperinnervées de souris sont plus élevés et l'accumulation de PrPsc est plus importante, comparativement aux souris témoins. Ces résultats tendent à montrer qu'en plus de participer au transport du prion, les nerfs sympathiques l'accumulent et permettent sa réplication dans les tissus lymphoïdes (Haïk, 2003).

L'implication du nerf vague comme autre voie d'entrée des prions dans le SNC a également été proposée (Baldauf, 1997).

De nombreux détails ne sont pas encore élucidés. Par exemple, on ne sait pas si le prion est directement transféré des FDC vers les terminaisons nerveuses, ou si d'autres populations cellulaires sont impliquées. Cette dernière hypothèse est séduisante car les FDC ne semblent pas présenter de contact physique avec le tissu nerveux périphérique (Aguzzi, 2003).

En outre, le mode de diffusion de l'agent infectieux dans le système nerveux périphérique (SNP) est encore débattu, bien que la nécessité de la présence de la PrPc soit clairement démontrée. Deux hypothèses peuvent être formulées : un transport rétro-axonal de la PrPsc, ou bien l'infection des cellules de Schwann (Aguzzi, 2003).

III/ 5. Les mécanismes mis en jeu dans les phénomènes de neurodégénérescence

Aucune des lésions du système nerveux central n'est constante : spongiose et perte neuronale, hypertrophie et prolifération des astrocytes, plaques amyloïdes. Seules les dernières sont spécifiques car elles témoignent de l'accumulation de la protéine anormale.

En ce qui concerne la perte neuronale, certains arguments laissent à penser qu'elle pourrait résulter, au moins en partie, d'un processus de mort cellulaire programmée (Gray, 1999).

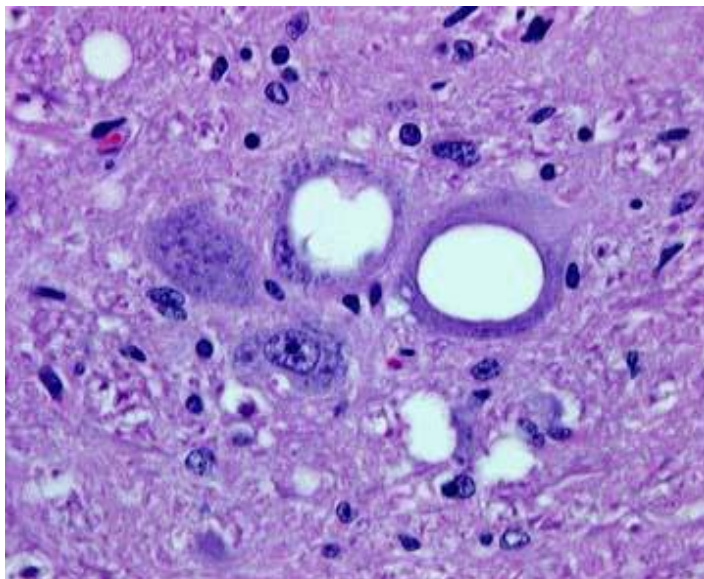
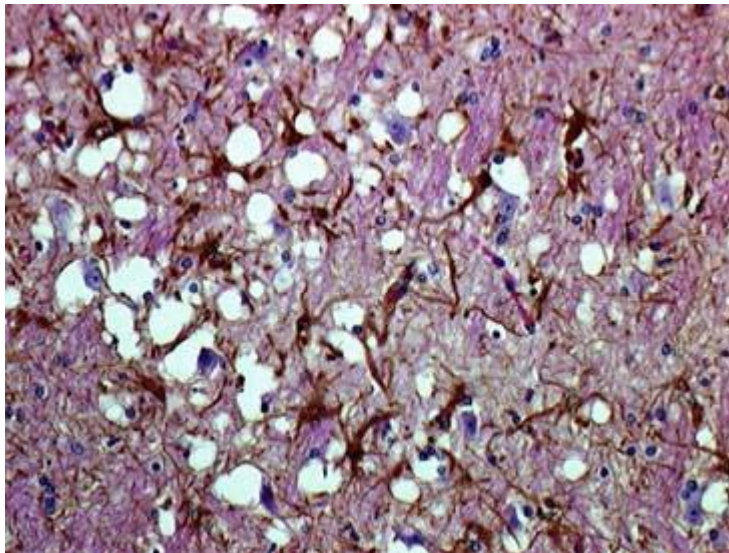


Photo 2 : Vacuolisation des neurones et du neuropile chez une brebis atteinte de tremblante. Grossissement 400. Coloration hématoxyline-éosine.

(CAU, P., (page consultée le 23 septembre 2006), Les maladies à prions : de la biologie cellulaire de la protéine vers le diagnostic et le traitement. Adresse URL : http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/prionindex.html).

Photo 3 : Gliose astrocytaire elle est mise en évidence par l'immuno-histochimie de la GFAP (glial fibrillary acidic protein). Les astrocytes sont marqués en brun. Grossissement 400.

(CAU, P., (page consultée le 23 septembre 2006), Les maladies à prions : de la biologie cellulaire de la protéine vers le diagnostic et le traitement. Adresse URL : http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/prionindex.html).



Il apparaît de plus en plus évident que la PrPsc ne peut pas, à elle seule, rendre compte des phénomènes de neurodégénérescence observés dans les maladies à prions. Il a en effet été montré que cette isoforme, résistante à la protéinase K, n'était pas toujours détectée dans les ESST (Lasmézas, 1997), en particulier dans les formes familiales humaines ou au cours de la transmission expérimentale de l'ESB.

Par ailleurs, et de façon plus remarquable encore, l'accumulation de PrPsc dans le cerveau n'est pas toujours accompagnée d'une neurodégénérescence, et on note une claire dissociation entre l'accumulation de PrPsc, les signes anatomopathologiques, et l'apparition des signes cliniques (Brandner, 1996 ; Gray, 1999).

En revanche, des formes intracytoplasmiques ou transmembranaires dérivées de la PrPc se sont révélées toxiques pour les cellules neuronales aussi bien en culture cellulaire que dans des modèles animaux (Harris, 2003 ; Ma, 2002).

Il a été suggéré que la neurodégénérescence pourrait être liée à la perturbation ou au détournement de l'action physiologique de la PrPc (Solfrosi, 2004). En effet, la fonction physiologique de la protéine du prion se rapporte – dans différents modèles expérimentaux – à la survie neuronale et à la défense contre le stress oxydatif, par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation cellulaire. L'altération du signal physiologique de la PrPc par un mécanisme encore inconnu provoquerait une mort cellulaire programmée, conduisant à un processus d'apoptose neuronale et de neurodégénérescence (Brandner, 2003).

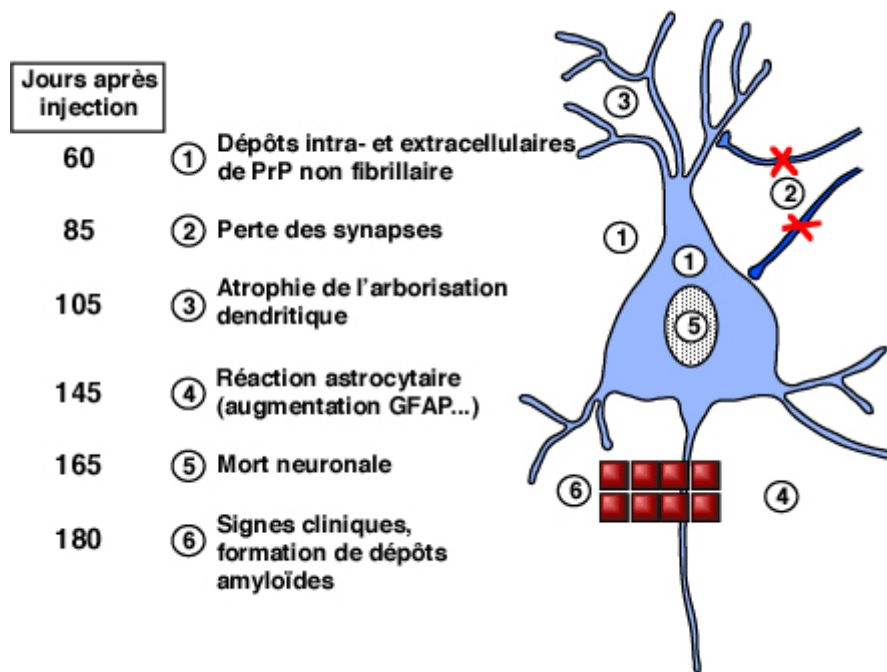


Fig. 8 : Les étapes de la neurodégénérescence après l'injection de la PrPsc. Noter la progressivité des lésions cellulaires dans le SNC. (HOPE, 2000, *Cur Op Genet Dev.*, **10**, 568-74).

III/ 6. Les conséquences pratiques des connaissances physiopathologiques des ESST

De façon générale, on sait que les tissus lymphoïdes jouent un rôle central dans les mécanismes pathologiques, mais des variations existent selon les modèles expérimentaux utilisés. Ces différences sont observées également dans le cas des ESST naturelles. Par exemple, les tissus du système réticulo-endothélial ne semblent pas participer à la physiopathogénie de l'ESB chez les bovins (Wells, 1998), ni à celle de la forme sporadique de la MCJ chez l'homme (Hill, 1999).

Cependant, la transmission expérimentale de l'ESB au mouton et à la souris montre que lors de transmission interspécifique, l'infectiosité est répartie plus largement dans l'organisme et n'est pas seulement limitée au SNC (Foster, 1996 ; Jeffrey, 2001 ; Maignien, 1999). Dans le cas du nvMCJ, la PrPsc a été détectée dans la rate, les nœuds lymphatiques et les amygdales (Bruce, 2001).

Cette observation trouve des applications pratiques très intéressantes : les amygdales constituent le tissu de choix pour les biopsies diagnostiques et pour l'évaluation de la prévalence du nvMCJ en phase préclinique de la maladie (Hill, 1999). Cependant, elle soulève également le spectre d'une possible transmission de l'infection par transfusion sanguine, greffe de tissus et d'organes, ou par l'intermédiaire des instruments chirurgicaux.

Ainsi, les différentes souches de prion induisent des variations dans les mécanismes pathologiques des ESST, cela étant particulièrement remarquable lors du passage de la barrière d'espèce. Comprendre la physiopathogénie de ces maladies est fondamental pour l'évaluation du risque et pour l'adoption de stratégies thérapeutiques et prophylactiques adaptées.

IV/ La transmission des ESST par transfusion sanguine

IV/ 1. Une hypothèse devenue réalité ?

Jusqu'en 2003, aucun cas humain de contamination iatrogène par le sang n'a été mis en évidence (Chamberland, 2002). Désormais, deux patients sont soupçonnés d'avoir développé le nvMCJ suite à une transfusion sanguine. Le premier cas « possible » a été annoncé le 17 décembre 2003 (Llewelyn, 2004). Le malade britannique atteint du nvMCJ, décédé à l'automne 2003, avait reçu en 1996 du sang d'un donneur, mort en 1999 de la même maladie.

Un second cas britannique a été suspecté en août 2004 (Peden, 2004). En 1999, le patient avait reçu le sang d'un homme qui, deux ans après, est décédé du nvMCJ. Le receveur est quant à lui mort 5 ans après la transfusion. Il n'a pas développé les symptômes de la maladie. La PrPsc a été retrouvée dans sa rate, mais ni dans son encéphale ni dans sa moelle spinale. Par ailleurs, il s'agit du seul exemple actuellement connu d'affection asymptomatique chez un individu hétérozygote méthionine-valine pour le codon 129.

Notons cependant que le prion n'a encore jamais été détecté dans le sang d'un patient humain touché par le nvMCJ. Cela peut probablement s'expliquer par le manque de sensibilité des méthodes de mise en évidence de la protéine pathologique dans ce tissu (Deslys, 2003).

La confirmation de façon définitive que la transmission des ESST peut se faire par transfusion sanguine est délicate et demande une amélioration des connaissances scientifiques actuelles. En effet, l'évaluation du risque transfusionnel englobe un certain nombre de facteurs à investiguer: l'identification du sang comme matériau à risque et la détermination de son taux d'infectiosité, l'efficacité de la voie intraveineuse comme voie de contamination, la dose infectieuse et les facteurs de susceptibilité à la maladie de l'hôte exposé.

IV/ 2. Le sang, un tissu infectieux

Les cellules sanguines et celles des tissus lymphoïdes semblent impliquées dans la diffusion de la PrPsc dans l'organisme, et cela pour plusieurs raisons. D'abord, la PrPc, dont la participation à ce mécanisme est indispensable, est exprimée de façon importante à la surface des cellules du sang et des organes lymphoïdes. Elle existe également sous forme soluble ou associée à des microparticules de membrane dans la fraction plasmatique (Starke, 2002 ; Simak, 2002). De plus, les tissus lymphoïdes sont les acteurs majeurs de la pathogénie des ESST (Bruce, 2001), en particulier dans les étapes qui précèdent la neuroinvasion. Enfin, toute atteinte du système immunitaire, telle qu'une splénectomie, une maladie immunodépressive, ou une manipulation génétique, peut entraver la progression de l'infection.

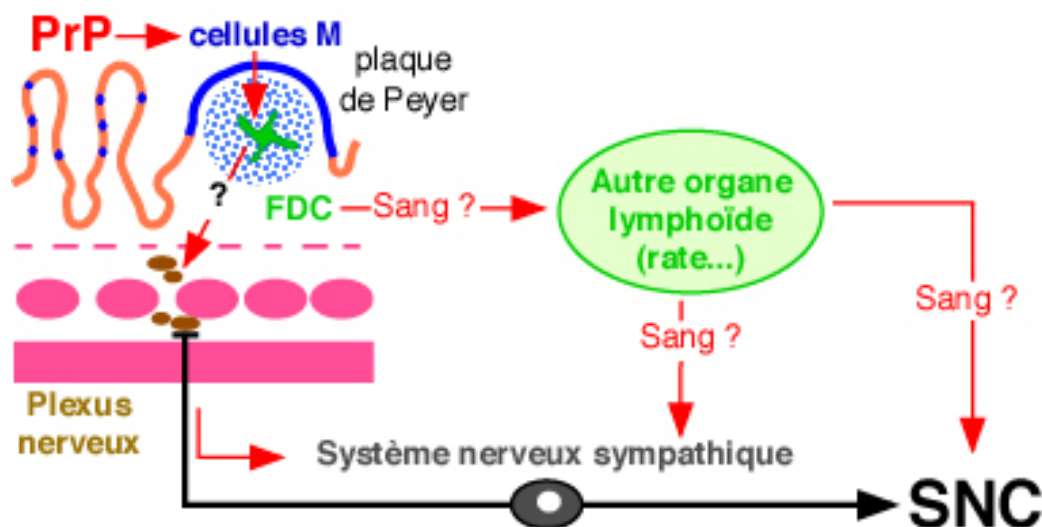


Fig. 9 : Voies d'invasion du SNC par le prion après son ingestion : le sang pourrait constituer un support de la propagation du prion dans l'organisme après l'infection des formations lymphoïdes. (CAU, P., (page consultée le 24 septembre 2006), Les maladies à prions : de la biologie cellulaire de la protéine vers le diagnostic et le traitement. Adresse URL : http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/PrPpath.html).

Par ailleurs, des études ont montré que le sang constitue un support de l'infection, car une infectiosité sanguine a été mise en évidence dans plusieurs cas d'ESST expérimentalement induites, et chez quelques animaux atteints de

tremblante naturelle (Bons, 2002 ; Hunter, 2002 ; Manuelidis, 1978). Dans ces expériences, l'infectiosité retrouvée dans le sang est généralement attribuée aux leucocytes, ce qui explique pourquoi de nombreux pays imposent la leucodéplétion du sang à transfuser pour limiter le risque de contamination. Cependant, une partie de l'infectiosité ne serait pas liée aux globules blancs mais répartie dans le sang total (Burthem, 2003 ; Brown, 1999).

Dans le cas du nvMCJ chez l'homme, contrairement aux formes classiques de MCJ, la PrPsc est retrouvée dans les amygdales, la rate, les ganglions lymphatiques, l'appendice, les plaques de Peyer, c'est-à-dire dans tous les tissus lymphoïdes. Le risque de contamination du sang est donc supérieur à ce qui était connu antérieurement (Bruce, 2001). Or, chez le mouton, contrairement au bovin, les tissus lymphoïdes participent de façon notable à la physiopathologie de l'ESB lors de contamination orale, ce qui en fait un bon modèle d'étude pour l'Homme.

A ce titre, la description fin 2000 d'un cas de transmission de l'agent de l'ESB à un mouton, par transfusion sanguine à partir du sang total d'un autre mouton contaminé expérimentalement par voie orale, est d'un intérêt majeur. Cette étude souligne le potentiel de la souche bovine à infecter le sang, même en phase préclinique de la maladie (Houston, 2000). En 2002, l'équipe de N. Hunter a confirmé cette observation ; elle a également apporté la preuve, pour la première fois, de l'infectiosité du sang chez des moutons atteints de tremblante dans des conditions naturelles, en phase préclinique et clinique de la maladie (Hunter, 2002).

Enfin, en 2005, une équipe de scientifiques a réussi détecter la PrPsc dans le sang par un test biochimique (Castilla, 2005). L'étude a porté sur du sang de hamster infecté expérimentalement par l'agent responsable de la tremblante. Les chercheurs ont exploité la méthode d'amplification PCMA (*protein misfolding cyclic amplification*). Fondée sur l'amplification de la PrPsc, elle a permis de mettre en évidence de très faibles concentrations de PrPsc dans le sang de hamsters cliniquement atteints. Cette étude ouvre des perspectives dans la mise au point d'un test précoce et non invasif pour le diagnostic des maladies à prions.

IV/ 3. Efficacité de la voie intraveineuse comme voie d'infection

Des données expérimentales indiquent que l'importance du risque d'infection dépend en partie de la voie d'exposition à l'agent pathogène. Ainsi, chez des souris infectées expérimentalement par l'agent de la tremblante, la voie intraveineuse est moins efficace que la voie intracérébrale pour produire l'infection, mais elle est largement plus efficace que la voie orale (Prince, 2003).

Plusieurs éléments peuvent expliquer les différences d'efficacité entre la voie orale, qui est la voie classique d'exposition au prion, et la voie intraveineuse.

Quand la contamination se produit par voie orale, la pénétration du pathogène est limitée par l'action enzymatique intestinale et par la barrière muqueuse. En revanche, la voie intraveineuse n'offre pas les mêmes moyens de défense ; ainsi, une charge infectieuse initialement faible peut tout de même conduire à la transmission de l'infection, grâce à un passage efficace du prion dans le sang du receveur (Burthem et Roberts, 2003).

En outre, il se pourrait que le transfert de l'infection par voie intraveineuse mette en jeu des mécanismes très différents de ceux impliqués dans l'ESB lors de contamination orale. Chez l'homme, de nombreuses cellules circulantes expriment la PrP^c à leur surface : plaquettes, monocytes, lymphocytes matures, globules rouges, ainsi que des microparticules de membranes cellulaires (Burthem et Roberts, 2003). En outre, des études ont établi que, dans la rate, l'infectiosité était associée à une large variété de cellules. Celles-ci ne semblent pas jouer de rôle majeur lors de contamination par voie orale, ni pour la réplication, ni pour la dissémination de la PrP^{sc}. En revanche, suite à une inoculation intraveineuse, on peut supposer que ces mêmes cellules sanguines transporteraient potentiellement la PrP^{sc} ; ainsi, dans le cadre de la transfusion sanguine, elles augmenteraient le risque d'infection et faciliteraient sa propagation (Burthem et Roberts, 2003).

En 2001, des scientifiques ont réussi à transmettre la souche bovine d'un primate à un autre primate, en injectant à ce dernier du tissu infectieux par voie intraveineuse (Lasmézas, 2001).

Une autre étude importante, dont les résultats ont été publiés en 2004, établit également l'efficacité de la voie intraveineuse pour la transmission de l'agent responsable de l'ESB chez les primates (Herzog, 2004). L'équipe de chercheurs français a infecté expérimentalement des macaques, par voie intraveineuse et par voie orale, avec la souche bovine, via des extraits cérébraux. Il apparaît que la

période d'incubation est beaucoup plus courte par voie sanguine. Par ailleurs, les chercheurs ont mis en évidence que le temps de survie des animaux infectés par voie intraveineuse est équivalent à celui de macaques infectés dans de précédentes expérimentations à la même forte dose, par voie intracérébrale.

De plus, ces travaux ont permis de préciser la répartition de l'agent infectieux dans les différents tissus des macaques atteints par l'infection (Herzog, 2004). Que ce soit suite à une contamination par voie orale ou par voie intraveineuse, les résultats sont les mêmes, avec un schéma physiopathologique qui semble identique. Ainsi, la PrPsc est retrouvée dans les amygdales, la rate, l'intestin du duodénum au rectum (dans les plaques de Peyer, le système nerveux entérique, les fibres nerveuses de la muqueuse intestinale), le système nerveux tant central que périphérique, locomoteur ou autonome. Par extrapolation à l'homme, la répartition du prion pathogène chez des patients atteints du nvMCJ suite à une transfusion sanguine serait donc large, incluant l'intestin et le SNP, ce que des autopsies réalisées chez des malades n'avaient pas permis d'observer.

IV/ 4. Barrière d'espèce et infection asymptomatique

La barrière d'espèce fait référence au relatif manque de sensibilité d'une espèce vis-à-vis des souches de prions issues d'autres espèces. La preuve en a été brillamment apportée par des expériences réalisées sur des souris génétiquement modifiées : elles ont permis d'établir le rôle majeur de la protéine PrP et de son gène dans le contrôle de la susceptibilité aux ESST (Büeler, 1993 ; Prusiner, 1993).

En effet, les souris dépourvues du gène *Prnp* infectées expérimentalement ne développent aucune lésion neuropathologique et leurs organes périphériques ou centraux ne sont le siège d'aucune réplication détectable (Büeler, 1993). Par ailleurs, des souris transgéniques exprimant le gène de la PrP de hamster ne sont pas sensibles aux agents d'origine murine, alors que leur inoculation par un agent de hamster conduit à l'infection de 100% des animaux avec un délai d'incubation comparable à celui observé chez le hamster.

C'est la séquence en acides aminés de la PrP qui constitue l'un des éléments majeurs de cette barrière : plus la séquence primaire de la PrPsc infectieuse ressemble à la séquence de la PrPc d'un animal, plus ce dernier sera susceptible à l'infection. Ainsi la barrière d'espèce se traduit-elle par une diminution parfois très

importante de l'efficacité de la transmission, avec une période d'incubation très augmentée, lors de l'injection d'un agent d'une espèce donnée à un animal d'une autre espèce (Scott, 1999).

La barrière d'espèce est un paramètre à prendre en compte pour évaluer le risque de transmission des ESST par voie sanguine. Elle limite le développement initial du nvMCJ lors du premier passage à l'Homme de la souche bovine. Cependant, une fois que la barrière est franchie, les passages secondaires de l'agent infectieux entre individus au sein d'une même espèce seraient facilités et la maladie évoluerait plus rapidement (Burthem, 2003). Ainsi, ce facteur qui a limité le transfert initial du prion des bovins à l'Homme ne protégerait pas les individus dans le cadre de la transfusion sanguine.

En outre, parce qu'elle diminue l'efficacité de la transmission de l'infection lors du passage d'une espèce à une autre, la barrière d'espèce pourrait expliquer l'existence d'individus porteurs d'infection subclinique (Collins, 2004). La notion d'infection latente ou subclinique concernant les ESST a été remise à l'étude suite aux résultats obtenus sur des souris. Hill et son équipe ont en effet montré qu'une souche de hamster, qui n'est pas à priori pathogène pour des souris normales, se réplique de façon importante dans ces animaux sans provoquer de symptômes. Par ailleurs, leurs tissus se révèlent être infectieux à la fois pour les souris et pour les hamsters (Hill, 2000).

Un élément frappant est l'augmentation du temps de survie et l'apparente bonne santé des animaux porteurs d'une infection chronique. Pourtant, le cerveau de ces souris asymptomatiques contient des titres infectieux élevés, comparables à ceux de souris au stade terminal de la maladie, et présente une dégénérescence spongiforme typique avec la mise en évidence de la PrPsc par la méthode du Western-Blot.

Par ailleurs, ces données sont à relier aux observations épidémiologiques recueillies sur la population anglaise : bien qu'une large partie d'entre elle ait été exposée à l'agent de l'ESB, la prévalence du nvMCJ reste pour l'instant assez faible. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la persistance du prion dans les organes lymphoïdes de façon systématique, associée ou non à une expression clinique. Une

persistance subclinique similaire de l'agent pathogène dans le SNC ne peut être exclue (Brandner, 2003).

La possibilité d'un portage chronique asymptomatique de l'infection doit amener à considérer d'une part l'existence potentielle de réservoirs qui, au moins théoriquement, pourrait expliquer le caractère endémique de certaines ESST et conduirait à repenser les mesures actuelles de contrôle de ces maladies, afin d'éviter en particulier l'entrée dans la chaîne alimentaire de bovins porteurs subcliniques de l'agent de l'ESB (Brandner, 2003).

D'autre part, elle amène à prendre en compte le risque de transmission secondaire ; ainsi, une seconde vague de cas de nvMCJ pourrait-elle être la conséquence d'une transmission inter-humaine de la maladie suite à des contaminations iatrogènes à partir de porteurs asymptomatiques (dons de sang ou d'organes) (Hopkin, 2004). Un problème clef actuellement est le manque complet de données épidémiologiques sur ces porteurs probables dans la population.

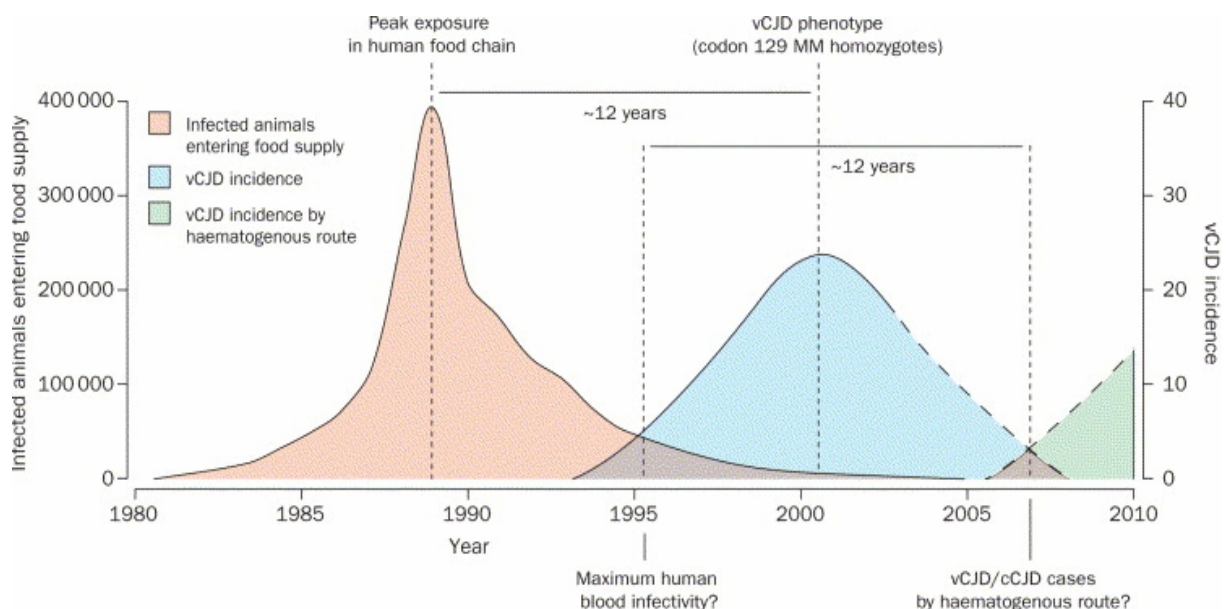


Fig. 10 : Evolution temporelle du nombre de bovins atteints d'ESB entrant dans la chaîne alimentaire humaine et, consécutivement, du nombre de nouveaux cas de nvMCJ. vCJD = nouveau variant de la MCJ ; cCJD = MCJ classique. (COLLINS, 2004).

IV/ 5. La susceptibilité de l'hôte exposé à l'infection

D'après ce que nous venons de voir, il semble bien que tous les hommes d'une population exposée à l'agent de l'ESB ne soient pas également sensibles au nvMCJ. De toute évidence, le génotype des individus joue un rôle majeur dans la probabilité de survenue de l'infection et influence de façon significative la longueur de la période d'incubation : l'hétérozygotie au codon 129, ainsi que l'homozygotie valine-valine pour ce même locus, retarderaient l'apparition de la maladie, voire augmenteraient la résistance à l'infection.

Chez les animaux, les ovins sont le meilleur exemple du rôle de la génétique : l'allèle ARR du gène Prnp confère une résistance des moutons à la tremblante, tandis que l'allèle VRQ les rend très sensibles. Notons toutefois que plusieurs cas de tremblante atypiques chez des animaux homozygotes ARR ont été annoncés en France et dans d'autres pays européens (Benestad, 2003). En revanche, l'influence du génotype sur la sensibilité des bovins à l'ESB n'a jamais été démontrée.

Toutefois, la génétique n'est pas le seul facteur à influencer l'incidence d'une ESST dans une population. Chez le mouton, le polymorphisme du gène Prnp, bien que très influent, n'est pas corrélé directement à l'incidence de la tremblante et l'environnement semble jouer un rôle non négligeable (Foster, 2001). Les facteurs de prédisposition aux ESST restent encore largement méconnus, que ce soit chez l'Homme ou chez les animaux.

V/ Le rôle du rein dans la clairance des protéines plasmatiques et paramètres pharmacocinétiques de la PrP

V/ 1. Les principes généraux de l'excrétion rénale des protéines plasmatiques

Toute substance étrangère introduite dans l'organisme sera éliminée plus ou moins rapidement, à moins qu'elle ne se fixe de façon irréversible aux tissus. Le rein constitue l'un des organes majeurs de l'excrétion des protéines (Leblanc, 1997).

V/ 1. 1. Les paramètres de l'élimination

V/ 1. 1. 1. Le concept de clairance

Le paramètre de la clairance s'applique à tous les organes d'élimination. Si la clairance est déterminée à partir des concentrations plasmatiques, comme c'est généralement le cas, on parle de clairance plasmatique. Elle se définit comme le volume de plasma complètement épuré d'une substance par unité de temps (mL/min).

L'excrétion d'une protéine plasmatique hors de l'organisme peut se faire par plusieurs voies d'excrétion. Dans ce cas, la clairance totale (CI) est la somme des diverses clairances de chaque organe d'excrétion.

V/ 1. 1. 2. Le coefficient d'extraction

La clairance d'une substance par un organe d'élimination caractérise la capacité d'élimination de cet organe. Cette clairance dépend de variables physiologiques comme le débit sanguin ou la liaison de la substance aux protéines sanguines.

Une autre façon d'évaluer la capacité d'un organe à éliminer une molécule est de déterminer la vitesse d'extraction. La vitesse d'extraction est égale à la différence entre la vitesse d'entrée et la vitesse de sortie de la molécule de cet organe, et on l'exprime ainsi : Vitesse d'extraction = débit sanguin $\times (C_a - C_v)$,

où C_a est la concentration artérielle de la molécule et C_v la concentration veineuse.

Le rapport de cette vitesse d'extraction et de la vitesse d'entrée donne le coefficient d'extraction (E). La valeur de E varie de 0, quand il n'y a aucune extraction, à 1 quand toute la protéine est extraite du sang par l'organe d'élimination.

La clairance peut s'exprimer par : $Cl = E \times \text{débit sanguin}$. Pour $E = 1$, la clairance est égale au débit sanguin de l'organe d'élimination, car le volume complètement épuré de la substance dans l'unité de temps correspond au débit sanguin. C'est pourquoi certaines maladies, qui provoquent une diminution du débit sanguin, diminuent aussi la clairance, en particulier la clairance rénale.

Les différentes étapes de l'extraction rénale de la PrP hors du sang pourraient être résumées ainsi : 1) diffusion de la PrP dans le plasma à partir des cellules endothéliales ou des cellules sanguines, 2) passage à travers le filtre glomérulaire, 3) métabolisation par les cellules tubulaires et/ou action de protéases urinaires, 4) sortie vers la lumière tubulaire dans le liquide d'élimination (urine). Notons que la PrP^{sc} est une petite protéine dont le poids moléculaire est compris entre 33 et 45 kDa, ce qui lui permet donc d'être filtrée par le glomérule.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'excrétion rénale, un rappel anatomo-physiologique est nécessaire.

V / 1. 2. L'excrétion rénale

V/ 1. 2.1. Rappels anatomo-physiologiques

Le rein joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre hydrique, du pH et des concentrations des divers électrolytes et des molécules endogènes. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein.

Le débit plasmatique rénal est d'environ 12 mL/kg/min, et le débit sanguin rénal de 20 mL/kg/min chez un chien. Un volume plasmatique de 2.5 à 4 mL/kg/min est filtré par les glomérules, mais la presque totalité de ce volume filtré est réabsorbé dans les tubules, de sorte que de 1 à 2 mL/kg/h sont éliminés sous forme d'urine. Les tubules sont le site de la réabsorption de l'eau et d'autres substances. La présence d'une molécule dans les urines s'explique par la contribution de la filtration glomérulaire et, parfois, de la sécrétion tubulaire, laquelle permet le passage de cette substance du sang vers la lumière des tubules. Une partie plus ou moins importante retourne au plasma par la réabsorption tubulaire, laquelle permet le passage en sens inverse.

V/ 2. 2. 2. La filtration glomérulaire

Le passage de la molécule du plasma à travers la paroi glomérulaire est dû à un gradient de pression. Comme la pression dans la membrane glomérulaire est plus élevée d'un côté que dans l'autre, un volume de plasma appelé filtrat glomérulaire passe à travers cette membrane poreuse qui

ne laisse passer que les petites molécules. Les macromolécules, comme l'albumine, les globulines et autres protéines plasmatiques, ne traversent pas la membrane, ainsi que les molécules liées à ces protéines. En revanche, la protéine prion soluble, dont le poids moléculaire est compris entre 33 et 45 kDa, peut franchir librement le filtre glomérulaire. La vitesse de filtration glomérulaire est fonction du débit sanguin rénal.

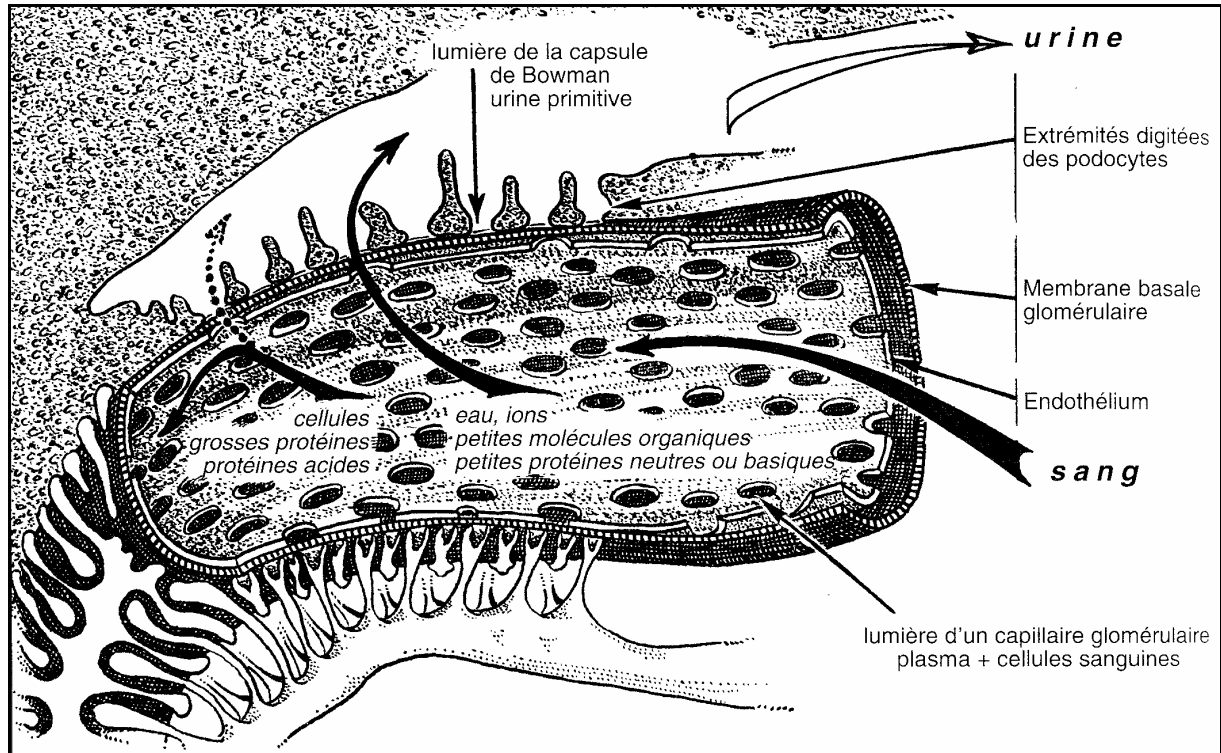


Fig. 11 : Schéma de l'ultrastructure du filtre glomérulaire et de ses principales caractéristiques de filtration. (Bases morphologiques et fonctionnelles de l'exploration rénale chez le chien. In : PMCAC éditions, Exploration biologique du rein. Les indispensables de l'animal de compagnie, 1996).

La clairance glomérulaire d'une molécule non liée aux protéines plasmatiques correspond au volume de filtrat glomérulaire. Pour une molécule liée aux protéines plasmatiques, la clairance glomérulaire est égale au produit de la fraction libre et du débit de filtration glomérulaire (DFG). S'il n'y a aucune sécrétion tubulaire ou réabsorption, la quantité filtrée sera éliminée dans les urines. La créatinine, qui est une substance endogène, ainsi que l'inuline, sont utilisées pour évaluer la fonction rénale, car leur clairance rénale correspond au DFG.

VI / 1. 2. 3. La sécrétion tubulaire

Les protéines de faible poids moléculaire sont filtrées, et quelques-unes passent en même temps du sang vers la lumière des tubules par un mécanisme de transport actif appelé sécrétion tubulaire, mécanisme situé dans le tubule proximal.

Si la totalité de la molécule qui est présentée aux reins est excrétée par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire et s'il n'y a aucune réabsorption, alors la vitesse d'excrétion rénale s'écrit :
 $\text{vitesse d'excrétion} = \text{vitesse de filtration} + \text{vitesse de sécrétion}.$

V/ 1. 2. 4. La réabsorption tubulaire

Une protéine, filtrée seulement ou filtrée et sécrétée, peut être réabsorbée au niveau des tubules. Plusieurs substances endogènes comme les électrolytes, le glucose et les acides aminés sont réabsorbés par transport actif. Les substances exogènes sont généralement réabsorbées par diffusion passive selon leur liposolubilité, leur degré d'ionisation et leur masse moléculaire. Seule la fraction non ionisée au pH urinaire est réabsorbée.

En général, les protéines de poids moléculaire inférieure à 25 kDa subissent une très forte clairance rénale. Toutefois, l'élimination urinaire de ces mêmes protéines sous forme inchangée est souvent faible, voire quasi-nulle, car elles sont fortement réabsorbées au niveau tubulaire, puis fragmentées par les systèmes enzymatiques des cellules tubulaires. Il s'ensuit une réabsorption systémique de peptides et d'aides aminés provenant de la dégradation de la protéine.

La vitesse d'excrétion rénale est donc le résultat final de la contribution relative de la filtration glomérulaire, de la sécrétion tubulaire et de la réabsorption tubulaire. Elle peut s'exprimer ainsi :
 $\text{Vitesse d'excrétion} = \text{vitesse de filtration} + \text{vitesse de sécrétion} - \text{vitesse de réabsorption}.$

V/ 1. 2. 5. La clairance rénale

La paramètre qui décrit le mieux la capacité d'excrétion du rein est la clairance rénale, qui s'exprime ainsi : $Cl_r = \text{vitesse d'excrétion rénale} / \text{concentration plasmatique}$. Une substance non liée aux protéines plasmatiques, qui est filtrée, non sécrétée et non réabsorbée, a une clairance rénale égale au débit de filtration glomérulaire, qui correspond à la valeur de la clairance de la créatinine endogène.

Une protéine filtrée, complètement sécrétée et non réabsorbée, a une clairance plasmatique rénale égale au débit plasmatique rénal. Une molécule filtrée et plus ou moins réabsorbée a une clairance rénale qui varie selon le degré de réabsorption tubulaire, la valeur maximale de cette clairance correspondant au taux de filtration glomérulaire si la molécule est très peu réabsorbée.

V/ 2. Les conséquences de l'insuffisance rénale sur la clairance plasmatique des protéines

La présence d'une insuffisance rénale (IR) est susceptible de provoquer des altérations importantes dans la pharmacocinétique des protéines plasmatiques.

De façon générale, la clairance des protéines éliminées par la filtration glomérulaire est diminuée en insuffisance rénale et le temps de demi-vie d'élimination de ces protéines est, par conséquent, allongé. Par ailleurs, l'IR peut altérer la sécrétion tubulaire proximale de certaines molécules. Cette sécrétion généralement assurée par des transporteurs tubulaires peut être rapidement saturée du fait que la quantité de protéines présente aux sites de sécrétion augmente à mesure que la capacité d'élimination rénale diminue.

V/ 3. Devenir de la PrP après son administration par voie intraveineuse

Les données présentées ici sont issues de la thèse de S. Ithurrealde intitulée : « Analyse de la disposition de la protéine du prion recombinante ovine administrée par voie intraveineuse chez la brebis ». Les réalisations expérimentales visaient à analyser le devenir d'une protéine recombinante (PrPrec), utilisée comme modèle de la protéine infectieuse, après son introduction par voie sanguine chez des brebis saines (Ithurrealde, 2004).

Tout d'abord, cette étude montre que la valeur de clairance plasmatique de la PrP est faible : elle ne représente qu'un petit pourcentage du débit cardiaque d'une brebis (3% dans les conditions expérimentales de l'étude). L'aptitude de l'organisme à éliminer la PrP du plasma est donc limitée, ce qui renforce l'hypothèse d'un risque de transmission des ESST par transfusion sanguine.

De plus, la valeur de clairance plasmatique déterminée dans ces travaux est du même ordre de grandeur que le débit de filtration glomérulaire, ce qui est compatible avec l'hypothèse selon laquelle la PrP est éliminée par les reins. Cependant, la PrP recombinante n'a pas été détectée dans les urines des animaux dans les 12 heures qui ont suivi l'administration de la protéine, peut-être par un manque de sensibilité de la méthode de dosage, ou bien suite à une modification de la structure de la PrP. En revanche, une méthode plus sensible a montré l'existence d'une forme tronquée de la PrP dans certains échantillons de ces urines (communication personnelle du Dr Gayraud), ce qui renforce l'hypothèse que le rein constitue l'un des sites d'élimination de la protéine.

Notons que les diverses publications évaluant la présence de l'agent infectieux dans les urines sont contradictoires. Une isoforme de la PrP résistante à la digestion par les protéases a été mise en évidence dans des urines de hamsters atteints de tremblante subclinique, ainsi que chez celles de bovins touchés par l'ESB et de patients souffrant du nvMCJ (Shaked, 1999). Elle serait libérée dans la circulation sanguine à partir du SNC ou d'autres organes périphériques, et serait filtré par les reins. Son inoculation par voie intracérébrale à des hamsters ne provoque pas de signes cliniques d'encéphalopathie spongiforme.

Par ailleurs, le volume de distribution à l'équilibre de la PrP est petit ; la distribution de la protéine est largement limitée au secteur plasmatique, elle diffuse peu dans le secteur extravasculaire. Cela explique donc pourquoi, malgré une faible clairance, le temps moyen de résidence de la PrP dans l'organisme est bref.

Le rôle des organes émonctoires participant à la clairance de la PrP circulante a également été envisagé. Ainsi, l'administration de PrPrec par voie intracarotidienne a permis d'exclure l'existence d'un effet de premier passage au niveau du SNC dans la clairance de la PrP.

PARTIE 2 : REALISATIONS EXPERIMENTALES

I/ Introduction

Tous les individus d'une population ne présentent pas la même susceptibilité à l'agent pathogène des ESST. Tout facteur qui diminue les possibilités de défense d'un organisme face au prion constitue un facteur de risque. Dans le cadre de la transfusion sanguine, plus l'organisme sera capable d'éliminer rapidement la protéine infectieuse qui circule dans le sang, moins il sera exposé à l'agent pathogène. Or, d'après les résultats préliminaires d'une étude réalisée au laboratoire, le rein pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de clairance plasmatique de la protéine du prion; l'IR pourrait par conséquent augmenter la sensibilité d'un individu à l'infection, la transconformation de la PrPc en PrPsc pouvant alors être facilitée ou exacerbée par une plus lente élimination des protéines néoformées.

II/ Objectifs

Notre projet s'inscrit dans l'analyse du risque de la transmission iatrogène à l'Homme de l'agent du nvMCJ par la transmission de sang. Dans cette étude, nos objectifs étaient :

- de mettre en évidence le rôle du rein dans la clairance plasmatique de la protéine du prion ;
- d'évaluer l'incidence de l'IR sur l'élimination de la protéine endogène PrPc et sa caractérisation en tant que facteur de risque.

Les résultats présentés dans notre étude ont été obtenus à partir de deux modèles animaux. Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'une

néphrectomie bilatérale sur la clairance de la protéine du prion recombinante ovine administrée par voie sanguine à des brebis; cette protéine recombinante ovine a été utilisée comme modèle de la protéine pathologique.

Dans une deuxième partie, sur un modèle d'IR expérimentale et d'IR spontanée du chien, nous avons établi les concentrations plasmatiques en PrPc des animaux.

Préalablement à nos réalisations expérimentales, nous avons vérifié la spécificité du signal pour la PrP dans le plasma de chien avec notre méthode de dosage (validation des méthodes analytiques). Nous avons également évalué une éventuelle interaction de l'anticoagulant utilisé pour les prélèvements sanguins avec notre méthode de dosage de la PrP dans le plasma de chien et de brebis.

III/ Validation des méthodes analytiques

III/ 1. Objectifs

Nos objectifs étaient de :

- vérifier la spécificité du signal pour la PrP dans le plasma de chien prélevé sur EDTA, dosée par ELISA avec le couple d'anticorps de brebis SAF34 / 12F10-AchE ;
- évaluer une éventuelle interaction de l'EDTA et/ou de l'héparine avec le dosage ELISA de la PrP dans le plasma de chien et de brebis.

III/ 2. Procédures expérimentales

III/ 2.1. Méthodes analytiques : dosage de la PrP par immunométrie

III/ 2.1.1. Principe du dosage

Un premier anticorps anti-protéine du prion a été fixé au fond des puits, le second anticorps était couplé à l'acétylcholine estérase (AchE). La révélation a été obtenue après adjonction du réactif de Ellman contenant un substrat de l'AchE qui change de couleur après dégradation enzymatique. La coloration obtenue était jaune et la densité optique (DO) était évaluée par spectrophotométrie à 414 nm.

III/ 2.1.2. Produits

L'expérience 1 a été réalisée avec le variant V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ de la PrPrec ovine. Il a été fourni par l'UR 892 (INRA) en solution dans du tampon MOPS 0.1 M à la concentration de 1.1 mg/mL conservée à une température comprise entre 4 et 8°C.

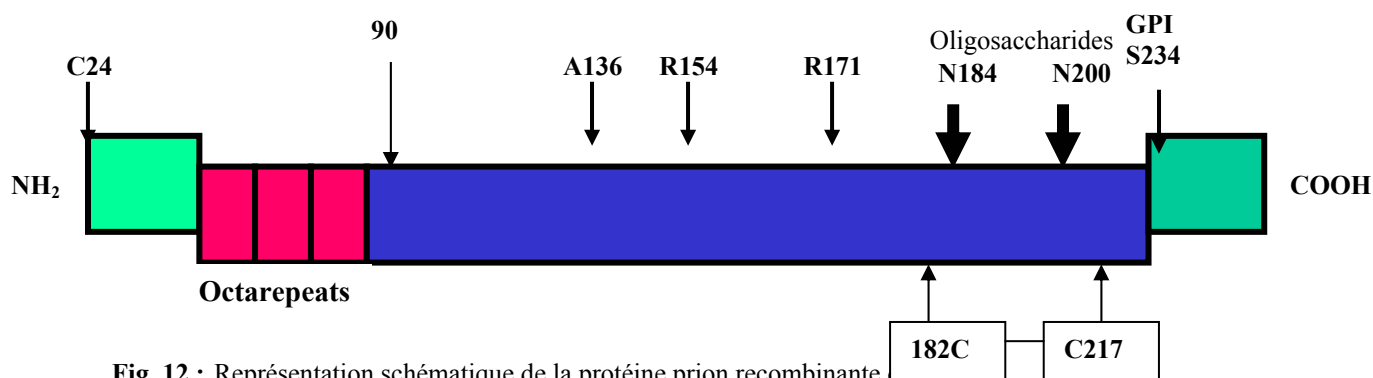


Fig. 12 : Représentation schématique de la protéine prion recombinante

L'anticorps utilisé était le SAF 34 (Spi Bio®) qui reconnaît la protéine du prion de toutes les espèces : il est dirigé contre un épitope situé dans la région N-terminale de la protéine qui contient des séquences « octarepeats » ; le traceur utilisé était un anticorps anti-prion couplé à l'acétylcholine estérase, le 12F10-AchE ou le 12F10-G4 (Spi Bio®), dirigé contre les résidus 155 à 173 de la protéine.

III/ 2.1.3. Préparation des plaques : fixation du premier anticorps

Une solution d'anticorps SAF 34 à 10 µg/mL a été préparée dans le tampon phosphate (0.05M, pH=7.4) et 150 µL de la solution d'anticorps SAF 34 ont été déposés dans chaque puit. Après une nuit à température ambiante, les puits ont été lavés 5 fois avec 300 µL de tampon de lavage (tampon phosphate 0.01M, pH=7.4, 0.05% tween 20). Trois cents µL de tampon EIA de conditionnement / saturation (tampon phosphate 0.1M, pH 7.4, BSA = 1g/L (fraction V, Sigma, réf. A7905), NaCl 0.15M, NaN3 0.01%) ont été déposés. Les plaques recouvertes d'un film plastique pouvaient être conservées à +4°C pendant 8 à 12 mois.

III/ 2.1.4. Dosage

A partir d'une plaque contenant le premier anticorps, le tampon de conditionnement a été aspiré, les puits ont été lavés 3 fois avec 300 μ L par puits de tampon de lavage.

Un volume de 100 μ L des échantillons plasmatiques a été déposé dans les puits et incubé pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Les puits ont été lavés 5 fois avec 300 μ L par puits de tampon de lavage. Après 5 minutes de trempage à température ambiante, sous agitation lente, les puits ont à nouveau été lavés 5 fois avec 300 μ L par puits de tampon de lavage.

Cent μ L d'une solution de traceur ayant une activité enzymatique de 1,25 UE/mL ont été distribués dans chaque puits. Après 2 heures d'incubation à +4°C, les puits ont été lavés 5 fois avec 300 μ L par puits de tampon de lavage. Après 5 minutes à température ambiante, sous agitation lente, les puits ont à nouveau été lavés 5 fois avec 300 μ L par puits de tampon de lavage.

Deux cents μ L de réactif de Ellman (8,5g NaCl dans 200 mL de tampon phosphate 0.5M, pH=7.4, 1g DTNB, 2.2g acétylthiocholine) ont été ajoutés et après 30 et 45 minutes d'incubation protégée de la lumière à température ambiante sous agitation, on a procédé à la lecture au spectrophotomètre à 414 nm. Les valeurs de DO ont été ajustées par régression non linéaire en utilisant le logiciel WinNonLin 4.0® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

III/ 2.2. Déplacement des anticorps SAF 34 libres

III/ 2.2.1. Objectif

L'objectif était de déterminer si une préincubation des échantillons plasmatiques avec des anticorps SAF 34 libres diminuait le signal sur ELISA de façon dose-dépendante par compétition avec les anticorps SAF 34 fixés sur la plaque. Il s'agissait donc de tester la spécificité du signal en vérifiant que la PrP ne se fixait pas sur la paroi indépendamment des anticorps SAF 34 fixés.

III/ 2.2.2. Préincubation des échantillons plasmatiques avec les anticorps SAF 34 libres

Les échantillons testés étaient 5 échantillons de plasma de chiens prélevés sur EDTA K3E dans des tubes en polypropylène. A 200 μ L de chaque échantillon ont

été ajoutés 20 μ L d'une solution d'anticorps SAF34 lyophilisée dans 2.5 ml de tampon phosphate (0.05M, pH=7.4), à la concentration de 80 μ g/ml. Le même protocole a été reproduit avec des solutions d'anticorps SAF 34 dont les concentrations étaient respectivement de 27, 9, 3 et 1 μ g/ml.

Les échantillons ont été préincubés pendant 1 heure sous agitation douce à température ambiante. Puis le dosage de la PrPc dans ces échantillons a été réalisé dans les conditions usuelles.

III/ 2.3. Déplacement des anticorps 12F10 libres

III/ 2.3.1. Objectif

L'objectif était de déterminer si l'ajout dans le plasma des anticorps 12F10 non marqués diminuait le signal sur ELISA de façon dose-dépendante par compétition avec les anticorps 12F10-AchE marqués. Il s'agissait donc de tester la spécificité du signal en vérifiant que les anticorps 12F10-AchE marqués ne se fixaient pas sur la paroi indépendamment de la PrP.

III/ 2.3.2. Dosage

Les échantillons testés étaient 2 échantillons de plasma de chien prélevés sur EDTA K3E dans des tubes en polypropylène.

On a incubé 100 μ l de chaque échantillon dans les conditions usuelles avec des anticorps SAF 34 fixés sur la plaque, puis on a ajouté des anticorps libres 12F10-AchE marqués à une concentration de 2,5 UE/ml, et des anticorps libres 12F10 non marqués à des concentrations décroissantes de 2.5, 0.5, 0.25 et 0.05 μ g/ml de solution tampon (NaPBS, 0.01 mM, pH 7.4). Le dosage de la PrPc dans ces échantillons a ensuite été réalisé dans les conditions usuelles.

III/ 2.4. Effet de l'héparine sur le dosage de la PrPc endogène dans le plasma

III/ 2.4.1. Objectif

Dans l'expérience 2, le sang des chiens a été recueilli dans des tubes EDTA en polypropylène. En revanche, dans l'expérience 3 au cours de laquelle était évaluée les concentrations plasmatiques en PrPc endogène des chiens atteints d'insuffisance rénale spontanée, les prélèvements ont été réalisés sur des tubes héparinés en polypropylène. Afin de pouvoir comparer les

valeurs des concentrations plasmatiques en PrPc obtenues à partir de ces deux modèles d'insuffisance rénale (expérimentale et spontanée), nous avons évalué l'effet des anticoagulants utilisés, EDTA ou héparinate de lithium, sur les concentrations de PrPc mesurées dans les échantillons sanguins prélevés sur nos chiens. Nous avons également estimé cet effet sur les concentrations en PrPrec d'une solution tampon contenant soit de l'héparine, soit de l'EDTA, avec des quantités croissantes de PrPrec. L'objectif était donc de déterminer s'il existait un effet lié à l'anticoagulant utilisé sur le dosage de la protéine prion endogène PrPc dans le plasma.

III/ 2.4.2. Dosage

Les échantillons testés étaient ceux de 11 chiens dont le sang a été recueilli dans des tubes en polypropylène, sur EDTA et sur héparinate de lithium. Pour le même animal, nous disposions donc de deux prélèvements. Le dosage de la PrPc dans ces échantillons a été réalisé dans les conditions usuelles.

III/ 3. Résultats

III/ 3.1. Déplacement des anticorps SAF 34 libres

La figure 13 présente l'évolution des valeurs de DO mesurées sur 5 échantillons plasmatiques de chien préincubés avec des concentrations croissantes d'anticorps libres SAF 34.

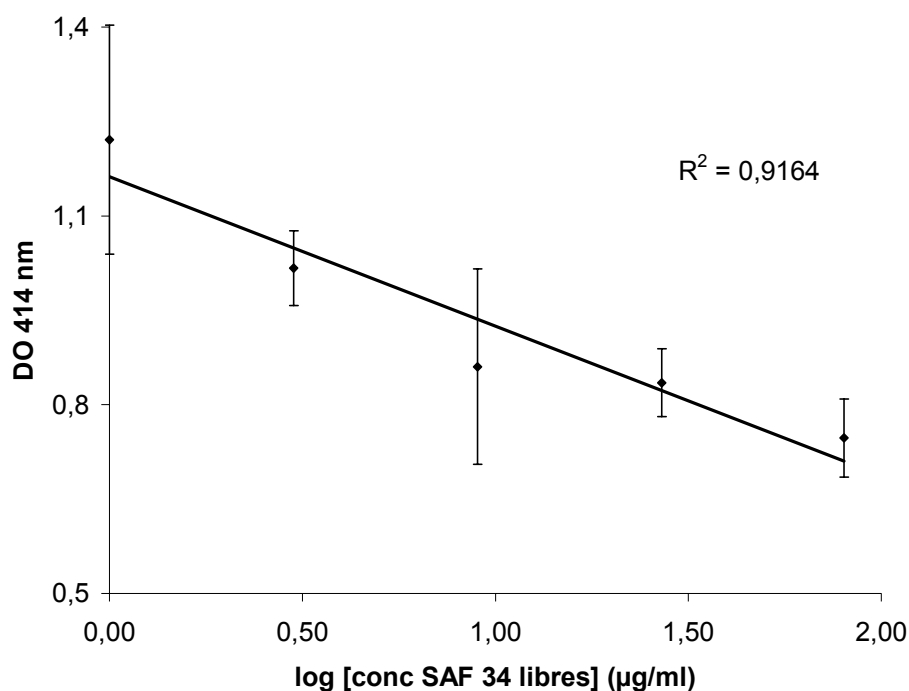


Fig. 13 : Représentation graphique de l'évolution des valeurs de DO (moyenne \pm ET) en fonction du logarithme (log) des concentrations en anticorps libres SAF 34 préincubés avec les échantillons.

Ainsi, les valeurs du log [conc SAF 34 libres] et celles de la DO étaient corrélées négativement. Il existait donc une compétition entre les anticorps SAF 34 fixés à la plaque et les anticorps SAF 34 libres. Le signal était spécifique : la PrP ne se fixait pas sur la plaque indépendamment de l'anticorps SAF 34 fixé.

III/ 3.2. Déplacement des anticorps 12F10 libres

La figure 14 présente l'évolution des valeurs de DO mesurées sur 2 échantillons plasmatiques de chien incubés avec des concentrations croissantes d'anticorps 12F10 non marqués.

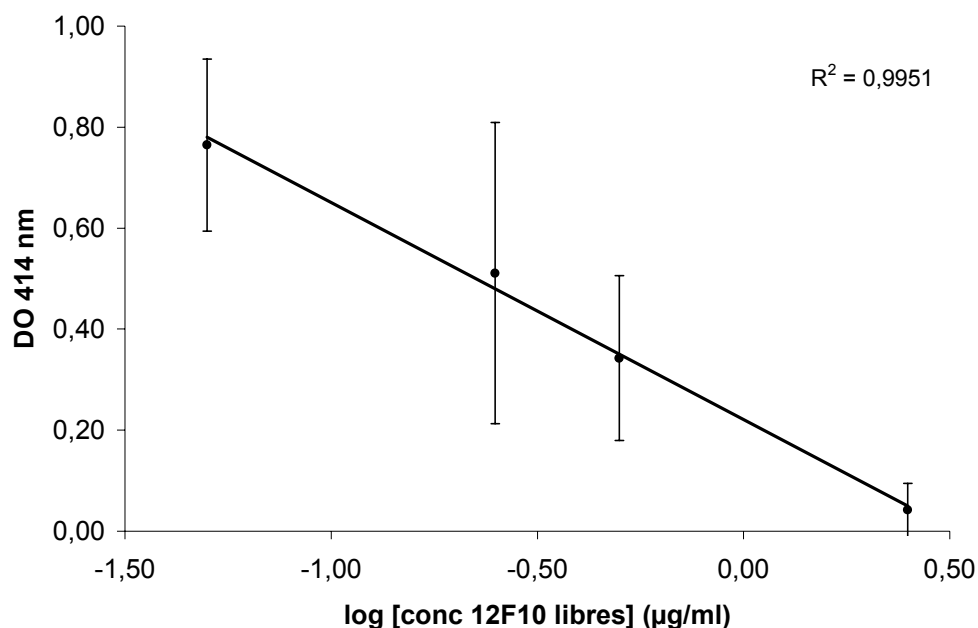


Fig. 14 : Représentation graphique de l'évolution des valeurs de DO (moyenne \pm ET) en fonction du log des concentrations en anticorps 12F10 libres.

Ainsi, les valeurs du log [conc 12F10 libres] et celles de la DO étaient corrélées négativement. Il existait donc une compétition entre les anticorps libres 12F10 non marqués et les anticorps libres 12F10-AchE marqués. Le signal était spécifique : les anticorps 12F10-AchE marqués ne se fixaient pas sur la paroi indépendamment de la PrP.

III/ 3.3. Effet de l'héparine sur le dosage de la PrPc endogène dans le plasma

La figure 15 présente la relation qui existe entre les valeurs des concentrations en PrPc mesurées dans les 11 échantillons sanguins, prélevés sur deux types d'anticoagulants, EDTA et héparinate de lithium.

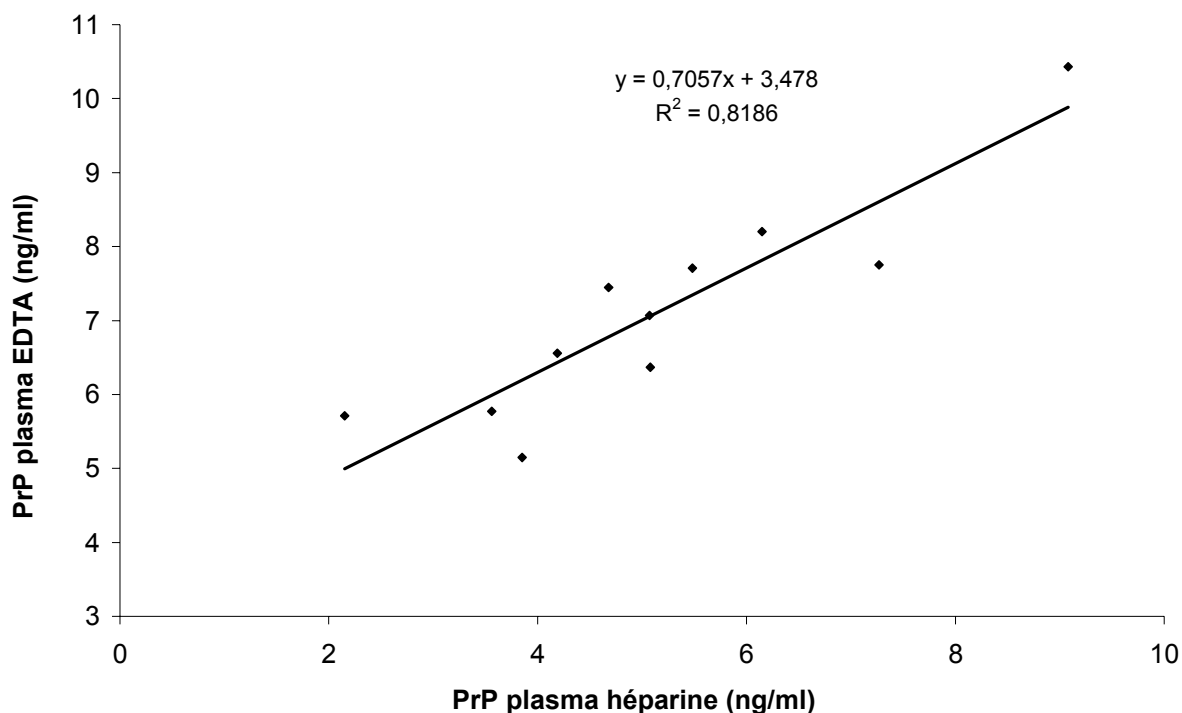


Fig. 15 : Représentation graphique de la corrélation linéaire entre les valeurs des concentrations en PrPc mesurées dans du plasma hépariné et celles des concentrations mesurées dans du plasma prélevé sur EDTA.

Les concentrations en PrPc mesurées étaient sous-estimées lorsque le sang était recueilli sur des tubes héparinés, ce qui n'était pas le cas sur EDTA. Nous avons obtenu une relation linéaire du type : $C_{\text{EDTA}} = 0.7057 C_{\text{hép}} + 3.478$ où C_{EDTA} représente la concentration en PrP de l'échantillon plasmatique prélevé sur EDTA et $C_{\text{hép}}$ la concentration en PrP dans le plasma hépariné prélevé sur le même chien.

Des gammes ont ensuite été réalisées dans du milieu tampon en ajoutant des quantités croissantes en PrPrec. Dans ce milieu tampon a été ajouté soit de l'héparinate de lithium, soit de l'EDTA. La figure 16 présente les valeurs de DO mesurées dans les deux milieux différents en fonction des concentrations en PrPrec.

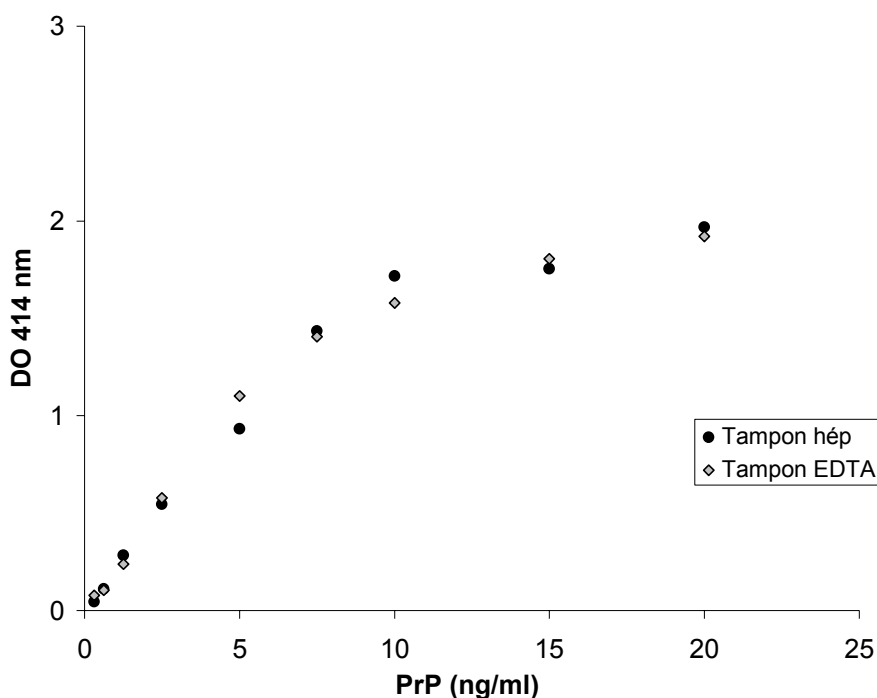


Fig. 16 : Représentation graphique des valeurs des DO mesurées dans un milieu tampon hépariné et dans un milieu tampon-EDTA en fonction des concentrations en PrPrec (ng/ml).

Les gammes étaient superposables. L'effet de l'héparine était donc lié au plasma. L'héparine pourrait avoir interagi avec la PrPc endogène en masquant des sites épitopes reconnus par l'anticorps 12F10 ; cette interaction n'a pas existé avec la PrPrec comme le montre la figure 16. Ou alors, l'héparine aurait interagi de façon non spécifique avec la matrice indépendamment de la PrP, mais cette interaction aurait également conduit à un masquage de sites épitopes.

Cet effet de l'héparine lié au plasma ne nous a pas permis de comparer les valeurs absolues des concentrations en PrPc des échantillons prélevés sur héparine et de ceux prélevés sur EDTA. Il a toutefois été possible d'apprécier les variations de concentrations en PrP liées à une IR si l'on ne comparait que des populations de chiens prélevés sur le même milieu.

IV/ Expérience 1 : Effet de l'ablation chirurgicale des reins sur la clairance plasmatique de la PrP chez la brebis

IV/ 1. Objectif

Notre objectif était d'étudier l'effet de l'ablation chirurgicale des reins sur la clairance plasmatique de la PrP et d'évaluer le coefficient d'extraction rénale de cette protéine.

IV/ 2. Matériels et méthodes

IV/ 2.1. Animaux

L'expérience a été effectuée avec 4 brebis de race Lacaune, adultes, de poids moyen 48 kg (\pm 8.5). Les brebis recevaient quotidiennement du foin *ad libitum* et 200g de concentrés, matin et soir, à heures fixes (8h00 et 16h00). Elles étaient également abreuvées à volonté.

IV/ 2.2. Protocole expérimental

Les brebis ont été pesées au cours des 48h qui ont précédé l'expérience afin d'ajuster les doses au poids vif.

Une expérience pilote a été réalisée avec deux brebis (B1 et B2). Cette expérience comprenait 2 périodes. Au cours d'une première période contrôle, les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ont été évalués après son administration IV à la dose de 0.02 mg/kg. Au cours de la deuxième période, le même protocole a été développé pour étudier les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec chez les brebis maintenues anesthésiées après une ablation chirurgicale des reins.

Afin de s'assurer que la différence entre les paramètres pharmacocinétiques avant et après néphrectomie n'était pas dû à un simple effet de l'anesthésie, nous avons :

- 1- évalué l'effet de l'anesthésie sur les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec chez une troisième brebis (B3).

- 2- comparé les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec chez une brebis (B4) anesthésiée avant et après néphrectomie.

Au cours de la période contrôle (avant néphrectomie), le protocole d'anesthésie utilisé était le même que celui adopté chez la brebis néphrectomisée, soit une anesthésie de 24h au thiopental sodique.

Les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ont été systématiquement évalués après l'administration IV de la PrPrec à la dose de 0.02 mg/kg au cours de 2 périodes distinctes (avant et après néphrectomie pour B1, B2 et B4 ; avant et après anesthésie pour B3), séparées de 24h pour B1, 14 jours pour B2, 15 jours pour B3 et 12 jours pour B4.

Les prélèvements sanguins ont été effectués toutes les 20 minutes pendant l'heure qui a précédé les administrations de PrP et aux temps 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, ensuite toutes les heures pendant 12 heures après l'administration et enfin au temps 24h.

La totalité du volume urinaire de la vessie a été prélevée avant l'administration, puis toutes les heures pendant 12 heures suivant l'administration de PrP. Pour chaque prélèvement, le volume des urines a été déterminé.

IV/ 2.3. Procédure expérimentale

IV/ 2.3.1. Anesthésie

Les brebis ont été anesthésiées par l'administration intraveineuse de barbituriques (thiopental sodique, Nesdonal®, 20 mg/kg à l'induction) et intubées. L'entretien de l'anesthésie a été assuré par l'administration de faibles doses supplémentaires de thiopental (0.2 à 0.3 mg/kg) toutes les 20 ou 30 min.

Après néphrectomie, les brebis étaient maintenues anesthésiées pour des raisons éthiques.

IV/ 2.3.2. Néphrectomie

La technique de néphrectomie a été adaptée de celle décrite par Horney et Archibald (1961). Les brebis ont été mises à jeun pendant 24h. Elles ont été

préalablement pesées et tondues très largement dans la région du flanc, de la pointe de la hanche jusqu'aux côtes et complètement du dos à la ligne blanche. Les animaux ont ensuite été anesthésiés par l'administration intraveineuse de barbituriques. Ils ont alors été placés en décubitus latéral sur une table chirurgicale, la trachée a été intubée et les membres ont été attachés. La région opératoire a été lavée avec une solution savonneuse d'iode (Vétédine savon®) et désinfectée avec de l'alcool 70° et avec une solution iodée (Vétédine solution®).

La peau a été incisée ventralement sur 10 cm, en arrière de la dernière côte et juste en dessous de processus transverse de la deuxième vertèbre lombaire. Le tissu sous-cutané et les muscles abdominaux ont été dilacérés à la main dans le sens des fibres. Le péritoine est alors apparu. Le rein droit était situé en regard de la deuxième côte et des processus transverses des 2 premières vertèbres lombaires. Le rein gauche était situé plus caudalement, et plus profondément, un peu à droite du plan médian, appendu sous les vertèbres lombaires, entre la deuxième et la cinquième vertèbre lombaire.

Le rein a été palpé en région sous lombaire. Il a été extériorisé de sa loge, amené délicatement au niveau de la plaie opératoire et la capsule adipeuse du rein a été dilacérée. Trois pinces clamp larges ont été placées au niveau du pédicule contenant l'uretère, la veine et l'artère rénale. Deux ligatures transfixiantes ont été placées sous le clamp proximal. Le pédicule a ensuite été coupé au-dessus de la pince clamp et un long chef d'une ligature a permis de vérifier l'absence de saignement du pédoncule vasculo-nerveux après l'ouverture de la pince clamp. La même opération a été réalisée sur le flanc gauche.

Les plans musculaires ont été suturés ensemble par un surjet simple avec du fil résorbable. La peau a été suturée avec du fil irrésorbable par des points séparés.

IV/ 2.3.3. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à l'aide de cathéters intravasculaires. Le sang (5 mL) a été recueilli dans 1 tube en polypropylène contenant de l'EDTA. Le sang a été immédiatement mélangé par retournement et rapidement centrifugé. Le plasma a été réparti en 3 fractions aliquotes de 0.5 mL dans des tubes Eppendorf® de 1.5 mL et conservé à une température inférieure à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dosages.

IV/ 2.3.4. Prélèvements urinaires

Les brebis ont été équipées avec une sonde de Foley siliconée (charrière 12, Rusch) maintenue en place à l'aide du ballonnet pendant toute la durée de l'étude. L'extrémité de la sonde a été obturée entre les prélèvements. La totalité des urines de la vessie a été prélevée toutes les heures à l'aide d'une seringue de 50 mL. Un échantillon de 500 µL d'urine a été prélevé et placé dans un tube Eppendorf de 1.5 mL. Le volume restant a été placé dans un tube en polypropylène de 10 mL. Les échantillons ont été conservés à -20°C .

IV/ 2.3.5. Préparation de la solution de PrPrec

Pour l'ensemble des administrations, une solution de PrPrec ovine a été préparée à la concentration de 0.2 mg/mL dans du plasma de brebis. La solution préparée a été aliquotée et conservée à -20°C . Deux fractions aliquotes de 200 µL ont été prélevées et conservées à une température inférieure à -20°C pour permettre de déterminer avec précision la dose administrée.

IV/ 2.3.6. Dosage de la PrPrec

La PrPrec a été mesurée avec la même méthode que celle décrite au cours de la validation de méthodes (dosage par immunométrie), à l'exception du premier anticorps. Celui-ci était le BAR 210 qui reconnaît de façon spécifique la protéine du prion ovine dans la région N-terminale (épitopes 26-34). Avec cet anticorps, la PrPc basale (avant injection de la PrPrec) n'était pas détectée.

Les standards et les contrôles qualité étaient des solutions du variant VRQ de la PrPrec préparés dans du plasma de brebis aux concentrations respectives de 0, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 15 et 20 ng/mL pour les standards et 3, 6 et 12 ng/mL pour les contrôles qualité et conservés à -20°C .

IV/ 2.4. Analyse pharmacocinétique des données plasmatiques

Seule l'analyse des données plasmatiques a été possible, car nous n'avons pas pu détecter la PrP dans les urines avec notre système de dosage. Les paramètres pharmacocinétiques ont été évalués à l'aide d'une analyse non compartimentale.

La **clairance plasmatique (Cl, mL/kg/min)** a été calculée selon l'équation 1 :

$$Cl = \frac{Dose}{AUC_{(0-tlast)}} \quad \text{Equation 1}$$

Où Dose est la dose de PrP administrée à la brebis par voie IV en mg/kg.

$AUC_{(0-tlast)}$ (ng.min/mL) est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en PrP en fonction du temps, calculée en utilisant la méthode des trapèzes linéaires de $t = 0$ à $t = last$. $t = last$ est le temps qui correspond à celui de la plus petite concentration de protéine mesurable. L'aire sous la courbe a été calculée selon l'équation 2 :

$$AUC_{(0-tlast)} = \frac{\sum_{i=0}^{i=tlast} (t_{i+1} - t_i) \times (C_i + C_{i+1})}{2} \quad \text{Equation 2}$$

Où C_i est la concentration observée au temps t_i .

Le temps moyen de résidence de PrP (MRT, min) a été évalué selon l'équation 3 :

$$MRT = \frac{AUMC_{(0-tlast)}}{AUC_{(0-tlast)}} \quad \text{Equation 3}$$

Où l' $AUMC_{(0-tlast)}$ est l'aire sous la courbe du premier moment statistique définie selon l'équation 4 :

$$AUMC_{(0-tlast)} = \frac{\sum_{i=0}^{i=tlast} (t_{i+1} - t_i) \times (t_i \times C_i + t_{i+1} \times C_{i+1})}{2} \quad \text{Equation 4}$$

Le volume de distribution à l'équilibre (Vss, mL/kg) a été calculé selon l'équation 5 :

$$V_{ss} = Cl \times MRT \quad \text{Equation 5}$$

Le coefficient d'extraction rénal (E_r , %) a été déterminé à l'aide de l'équation 6 :

$$E_r = 1 - \frac{AUC_{\text{contrôle}(0-t_{\text{last}})}}{AUC_{\text{néphrectomie}(0-t_{\text{last}})}} \quad \text{Equation 6}$$

$AUC_{\text{contrôle}(0-t_{\text{last}})}$ est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de PrP au cours de la cinétique de décroissance des concentrations en PrP obtenues après son administration IV, observées avant la néphrectomie.

$AUC_{\text{néphrectomie}(0-t_{\text{last}})}$ est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de PrP au cours de la cinétique de décroissance des concentrations en PrP obtenues après son administration IV, observées après la néphrectomie.

IV/ 3. Résultats

IV/ 3.1. Evaluation de l'effet de la néphrectomie sur les paramètres pharmacocinétiques de la PrP et calcul du coefficient d'extraction de la PrP par les reins, chez des brebis non anesthésiées pendant la période contrôle

La figure 17 illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec ovine, à la dose de 0.02 mg/kg, à deux brebis (B1 et B2) éveillées avant néphrectomie et chez les mêmes brebis maintenues anesthésiées après une néphrectomie bilatérale.

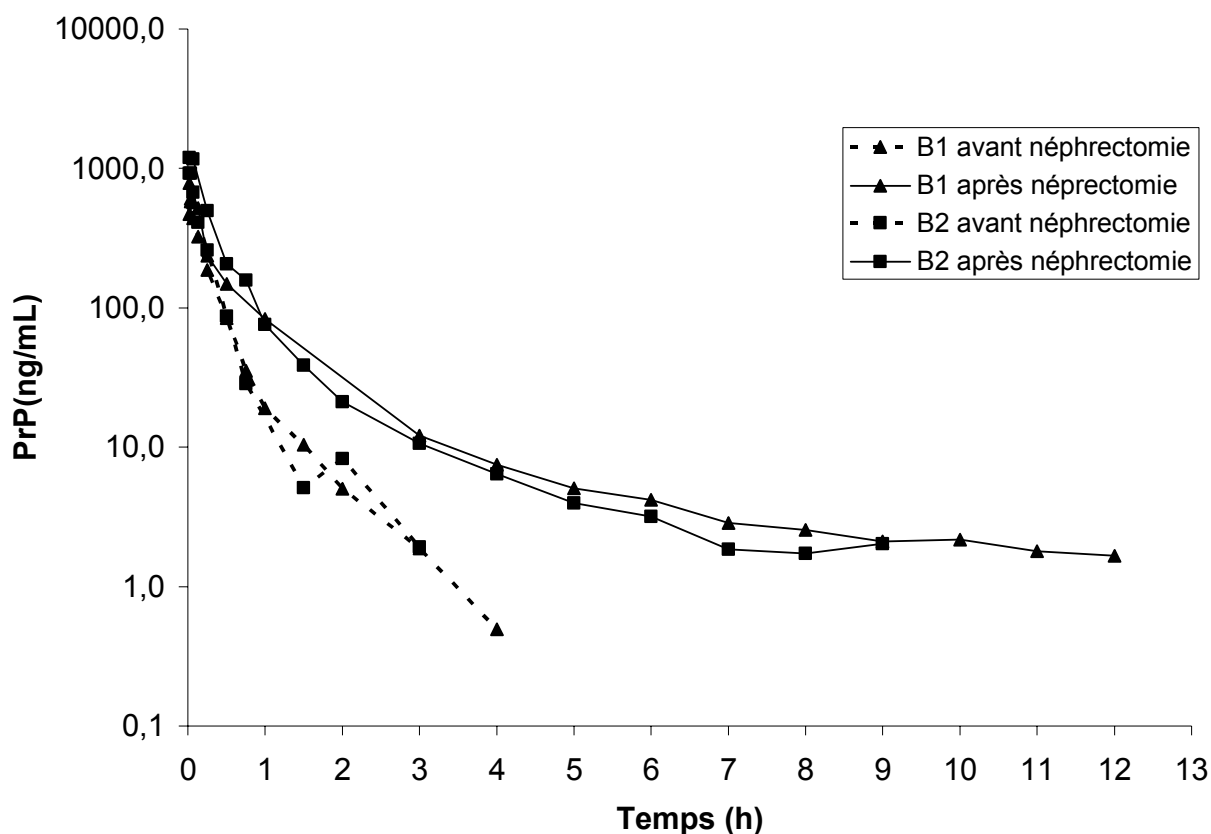


Fig. 17: Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec, à la dose de 0.02 mg/kg, à deux brebis avant (contrôle sans anesthésie) et après une néphrectomie.

L'observation visuelle de la figure 17 montre que la PrPrec ovine a été éliminée plus lentement du compartiment plasmatique après la néphrectomie. Le rapport des aires sous la courbe des concentrations plasmatiques évaluées avant et après néphrectomie est de 2.

Le tableau 1 présente les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine, calculés à partir de la cinétique de décroissance des concentrations en PrP observées avant et après néphrectomie.

	Brebis 1	Brebis 2
--	----------	----------

	<i>Contrôle</i>	<i>Néphrectomie</i>	<i>Contrôle</i>	<i>Néphrectomie</i>
<i>Cl (mL/kg/min)</i>	2.1	0.9	1.6	0.7
<i>Vss (mL/kg)</i>	46.9	61.1	27.4	27.3
<i>MRT (min)</i>	22.7	81,9	17.4	39.3
<i>Er (%)</i>	55.4		55.7	

Tabl. 1: Paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine administrée par voie IV, à la dose de 0.02 mg/kg, à deux brebis au cours de la période contrôle (sans anesthésie) et après une néphrectomie (brebis maintenues anesthésiées).

Ainsi, nous avons constaté une diminution de 57% de la clairance plasmatique de la PrPrec avant et après néphrectomie chez la brebis 1, et une baisse de 56% chez la brebis 2. Le temps moyen de résidence a été nettement augmenté. Le volume de distribution à l'équilibre a été peu modifié par l'ablation rénale. Le coefficient d'extraction rénale de la protéine était pratiquement identique chez les deux brebis : 55.4% et de 55.7%.

IV/ 3.2. Evaluation de l'effet d'une anesthésie sur le devenir de la PrP administrée par voie IV

La figure 18 illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec ovine, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis (B3) avec et sans anesthésie.

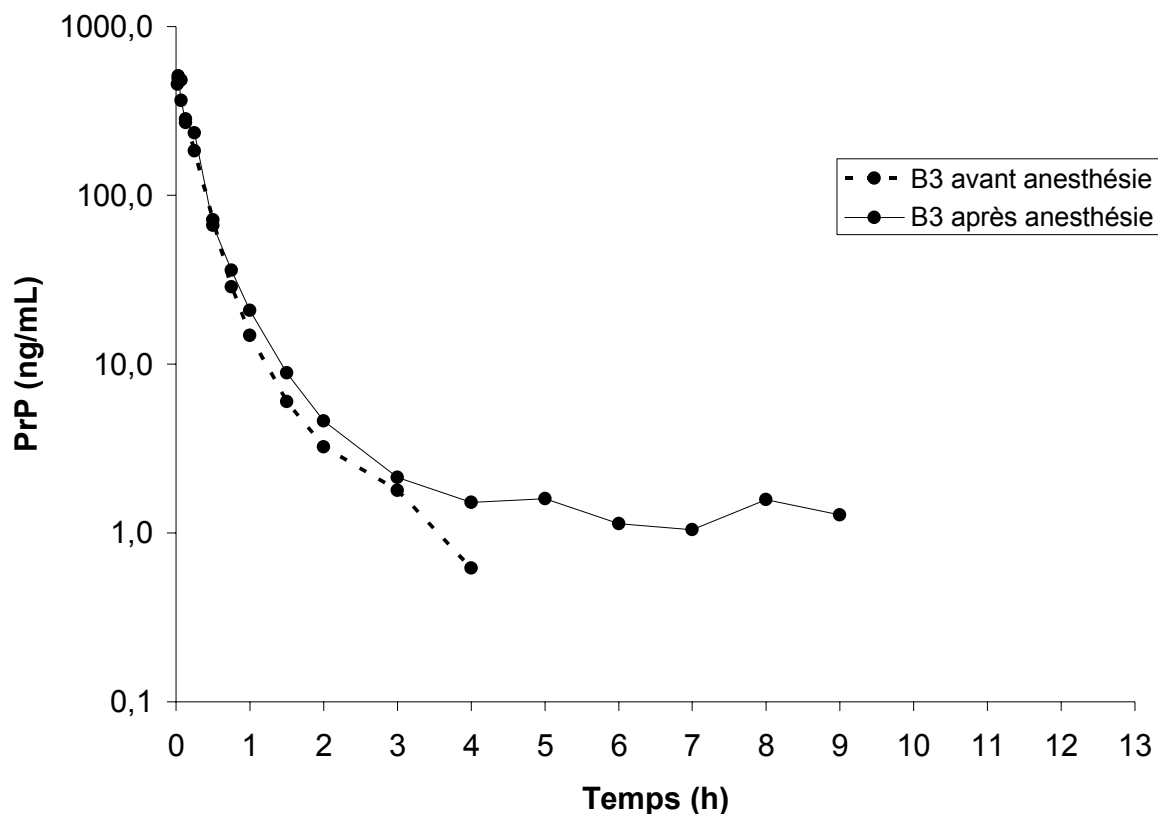


Fig. 18: Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis avant et après anesthésie.

L'observation visuelle de la figure 18 suggère que la PrPrec ovine a été éliminée du compartiment plasmatique à la même vitesse avant et après l'anesthésie : en effet, les courbes sont superposables au cours des 3 premières heures après l'administration de PrPrec. Le rapport des aires sous la courbe des concentrations plasmatiques évaluées avant et après anesthésie est de l'ordre de 1.

Le tableau 2 présente les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine calculés à partir de la cinétique de décroissance des concentrations en PrP observées au cours de la période contrôle (pas d'anesthésie) et au cours d'une anesthésie.

	Brebis 3
--	-----------------

	<i>Contrôle (pas d'anesthésie)</i>	<i>Anesthésie</i>
<i>Cl (mL/Kg/min)</i>	2.2	2.1
<i>VSS (mL/kg)</i>	45.0	81.4
<i>MRT (min)</i>	20.1	39.1

Tabl. 2: Paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine administrée par voie IV, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis avec et sans anesthésie.

L'anesthésie n'a pas modifié la clairance de la PrPrec, alors que le volume de distribution et le temps moyen de résidence étaient augmentés au cours de l'anesthésie.

IV/ 3.3. Evaluation de l'effet de la néphrectomie sur les paramètres pharmacocinétiques de la PrP et calcul du coefficient d'extraction de la PrP par les reins, chez une brebis anesthésiée pendant la période contrôle

La figure 19 illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec ovine, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis (B4) anesthésiée avant et après une néphrectomie bilatérale.

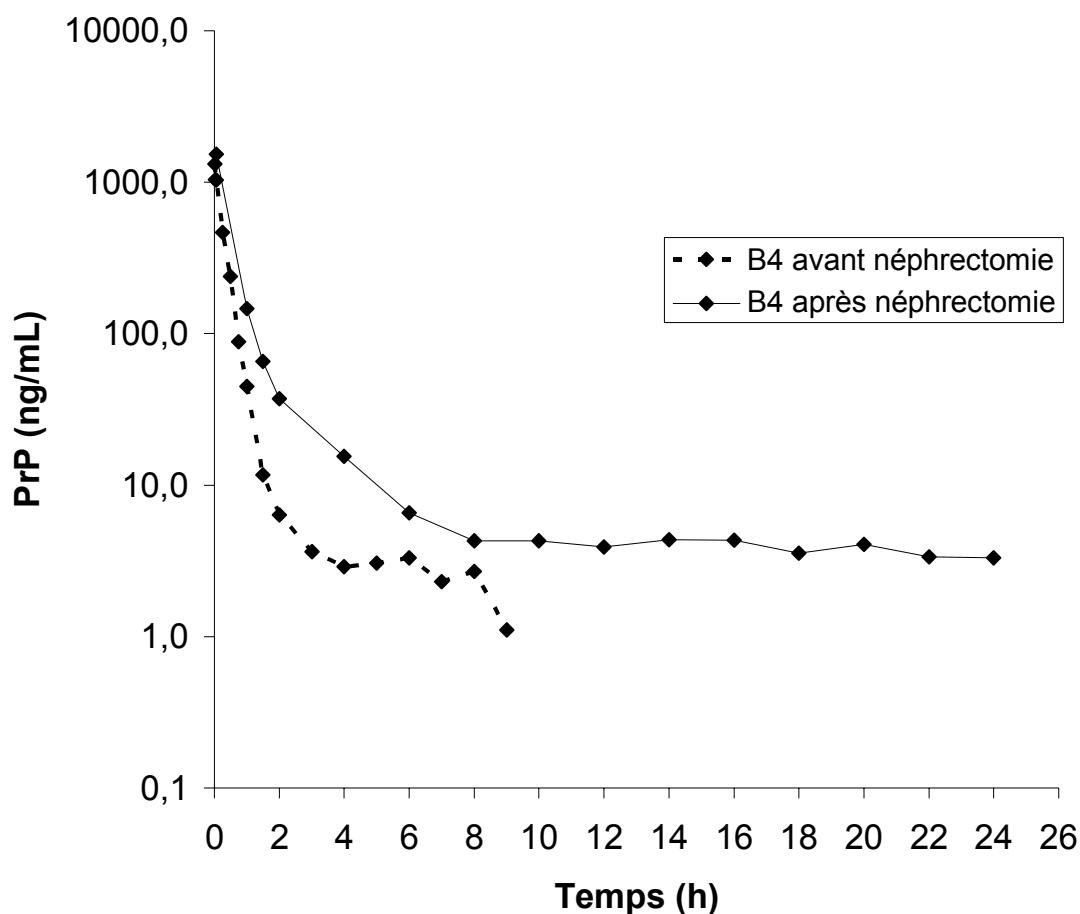


Fig. 19: Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en PrPrec après l'administration IV de la PrPrec, à la dose de 0.02 mg/kg, à une brebis anesthésiée avant et après une néphrectomie.

L'observation visuelle de la figure 19 montre que la PrPrec ovine a été éliminée plus lentement du compartiment plasmatique après la néphrectomie. Le rapport des aires sous la courbe des concentrations plasmatiques évaluées avant et après néphrectomie est de 2.8.

Le tableau 3 présente les paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine calculés à partir de la cinétique de décroissance des concentrations en PrPrec observées avant (contrôle avec anesthésie) et après une néphrectomie.

	Brebis 4
--	-----------------

	<i>Contrôle</i>	<i>Néphrectomie</i>
<i>Cl (mL/kg/min)</i>	0.8	0.3
<i>VSS (mL/kg)</i>	27.1	24.3
<i>MRT (min)</i>	32.4	81.9
<i>Er (%)</i>	64	

Tabl. 3: Paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec ovine administrée par voie IV, à la dose de 0.02 mg/kg à une brebis avant (contrôle avec anesthésie) et après une néphrectomie.

La néphrectomie a entraîné une diminution de 63% de la clairance plasmatique de la PrPrec. Le volume de distribution à l'équilibre n'a pas été influencé par la néphrectomie ; en revanche, le temps moyen de résidence a été nettement augmenté. Le coefficient d'extraction Er de la PrPrec par les reins a été estimé à 64%.

V/ Expérience 2 : Effet d'une insuffisance rénale expérimentalement induite sur la concentration plasmatique de la protéine endogène PrPc chez le chien

V/ 1. Objectif

Notre objectif était d'évaluer les conséquences d'une IR sur les concentrations plasmatiques en protéine endogène PrPc. Si la PrPc est éliminée par les reins comme la forme recombinante de la protéine, une IR devrait s'accompagner d'une augmentation des concentrations plasmatiques en PrPc. Des niveaux élevés en PrPc du plasma pourraient constituer un facteur de risque accru de transmission d'une ESST par transfusion sanguine, en exacerbant le processus de transconformation. Nous avons utilisé comme modèle d'étude des chiens chez lesquels une insuffisance rénale modérée a été expérimentalement induite (Watson, 2002). L'intérêt de ce modèle était multiple. Tout d'abord, nous avons travaillé avec une population dont nous maîtrisions différents paramètres, certains d'entre eux pouvant constituer un biais important. En particulier, les chiens avaient tous la même race, ils étaient homogènes en âge et en poids, et la proportion femelle/mâle était contrôlée. Par ailleurs, les conditions de prélèvement étaient standardisées : heure, matériel, technique, préparation des

animaux (mise à jeun). Enfin, nous maîtrisons l'intensité de l'insuffisance rénale induite (insuffisance rénale subclinique); la fonction rénale était précisément et régulièrement évaluée par des mesures de créatininémie, et par la réalisation de clairances plasmatiques de la créatinine et de l'exoiohexol, avant et après la chirurgie. Le contrôle de ces biais expérimentaux (non réalisable lors d'une étude épidémiologique rétrospective) a facilité l'interprétation des résultats concernant l'évaluation de l'impact réel de l'IR sur les concentrations plasmatiques en PrPc.

V/ 2. Matériel et méthodes

V/ 2.1. Animaux

V/ 2.1.1. Caractéristiques

L'étude a été conduite selon les directives du Ministère de l'Agriculture concernant le bien-être animal. Les chiens ont été opérés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ; la première partie de l'expérimentation y a été réalisée. Puis les animaux ont été transférés sur le site d'Intervet (Beaucouze, France), où les prélèvements ont été poursuivis.

L'expérience a été effectuée avec 16 chiens de race Beagle adultes en bonne santé, issus du domaine expérimental de Harlan (Gannat, France), âgés en moyenne de 4.0 ans (± 0.92). Ils pesaient entre 10.3 et 14.4 kg au début de l'étude. Le ratio femelle/mâle était de 5/3. Les animaux étaient vaccinés contre la maladie de Carré, l'hépatite de Rubarth, la parvovirose et la leptospirose.

Une population contrôle de 8 chiens Beagle, homogènes en âge, en poids et en taille avec la population expérimentale, a permis d'obtenir une valeur de référence pour la concentration plasmatique en PrPc chez des chiens sains. Cette population comprenait 4 femelles et 4 mâles, qui étaient âgés en moyenne de 4.95 ans (± 1.63). Le sang de ces animaux contrôle a été prélevé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les chiens expérimentaux, et de façon concomitante, le 4 mars 2003 (date du premier prélèvement).

V/ 2.1.2. Hébergement

A l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, les animaux avaient été placés dans des cages individuelles. Ils étaient lâchés dans une cour extérieure pendant 60 minutes chaque matin et nourris une fois par jour avec 240 g d'une alimentation du commerce (Royal Canin M25, Aimargues, France). Ils étaient abreuvés ad libitum.

Les conditions d'hébergement des animaux sur le site d'Intervet ne sont pas renseignées.

V/ 2.2. Procédure expérimentale

V/ 2.2.1. Lésions rénales

Les opérations pratiquées sur les 16 animaux se sont déroulées entre le 9 décembre 2002 et le 16 janvier 2003. Des lésions rénales modérées (réduction de 60% du taux de filtration glomérulaire) ont été induites au cours de la chirurgie. Les chiens ont reçu une prémédication d'acépromazine (0.1 mg/kg) en intramusculaire, 30 minutes avant l'induction d'une anesthésie générale avec du thiopental de sodium en intraveineuse (10 mg/kg). L'anesthésie a été maintenue avec un mélange d'isoflurane et d'O₂.

Les lésions rénales ont été induites par une procédure chirurgicale combinant néphrectomie du rein droit et électrocoagulation du rein gauche. Le rein droit a été libéré de son ligament le maintenant en position sous-lombaire ; artère rénale, veine rénale et uretère ont été isolés et ligaturés, puis le rein a été excisé. Une électrocoagulation au bistouri électrique a été réalisée sur des portions du cortex rénal gauche par petites incisions de 1 cm. Chaque chien a reçu 5 mg d'hydrochloride de morphine en intraveineuse à l'induction de l'anesthésie et à la fin de la chirurgie, ainsi que de la céphalexine en intraveineuse (15 mg/kg) à l'induction.

VI 2.2.2. Prélèvements sanguins

Le sang jugulaire (2 ml) a été recueilli dans des tubes en polypropylène EDTA et centrifugé (1.000 × g, 10 minutes, 4°C). Le plasma a été réparti en deux fractions aliquotes et immédiatement congelé à -20°C.

VI 2.2.3. Evaluation de la fonction rénale

Le fonctionnement du rein a été évalué par le dosage de la créatinine plasmatique et par la mesure des clairances plasmatiques de la créatinine et de l'exoiohexol.

La créatinine plasmatique a été dosée par une méthode enzymatique avec un analyseur (Ektachem 700 XR, Kodak, Johnson and Johnson Clinical Diagnostic Europe, 67 400 Illkirch Graffenstaden, France).

Les clairances plasmatiques de la créatinine et de l'exoiohexol plasmatiques ont permis l'évaluation du taux de filtration glomérulaire. Elles ont été déterminées selon des protocoles classiquement réalisés en laboratoire (Watson, 2002).

Les dosages de la créatinine plasmatique et les mesures de clairances ont été effectués 3 à 4 mois avant la chirurgie rénale et 15 à 30 jours après.

VI 2.2.4. Détermination de la PrPc

La PrPc plasmatique a été mesurée avec la même méthode que celle décrite au cours de la validation de méthodes (dosage par immunométrie). Le couple d'anticorps utilisé était le SAF 34 / 12F10. Les mesures ont été effectuées en 4 périodes de temps après l'opération.

VI/ 2.3. Récapitulatif : paramètres de population et calendriers des prélèvements réalisés

VI/ 2.3.1. Mesures des clairances plasmatiques de la créatinine et de l'exoiohexol

	Mesures de la clairance plasmatique de la créatinine	Mesures de la clairance plasmatique de l'exoiohexol
Dates :		
- avant chirurgie	21-23/08/02	30/09/02
- après chirurgie	17-22/01/03	27/01/03
Nombre d'animaux IR	6	10
Sexe	Mâle	Femelle
Age moyen en années	3	5

VI/ 2.3.2. Dosages de la créatinine plasmatique

Dates des dosages de la créatinine plasmatique	Nombre d'animaux IR	Ration femelle/mâle	Age moyen en années
21/10/02 avant chirurgie	16	5/3	4
27/01/03 après chirurgie			

VI/ 2.3.3. Détermination de la PrPc après la chirurgie

Dates de détermination de la PrPc	Nombre d'animaux IR	Ratio femelle/mâle	Age moyen en années	Intervalle chirurgie-dosage en jours (moyenne)
04/03/2003	16	5/3	4	67
03/07/2003	13	8/5	4	188
15/10/2003	14	9/5	4	292
09/04/2004	14	9/5	4	468

V/ 2.4. Analyse statistique

L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel Systat ® (version 10.0, SPSS Inc, Chicago, IL). La moyenne et l'écart-type ont été calculés pour les différentes variables. L'effet de l'insuffisance rénale induite sur les clairances de la créatinine et de l'exoiohexol, et sur les concentrations plasmatiques en créatinine et en PrPc, a été analysé par un test t de Student.

V/ 3. Résultats

V/ 3.1. Conséquences de la chirurgie sur la fonction rénale

Aucun signe clinique, à l'exception d'une faible polyurie-polydipsie, n'a été observé chez les chiens après la chirurgie rénale.

V/ 3.1.1. Mesures de la clairance plasmatique de la créatinine et de l'exoiohexol

Les mesures de clairance plasmatique de la créatinine et de l'exoiohexol, qui ont permis une évaluation du taux de filtration glomérulaire, ont été menées respectivement chez 6 chiens mâles et 10 chiens femelles de la population expérimentale. La figure 20 représente les valeurs de clairance en périodes pré- et post-opératoires chez les animaux.

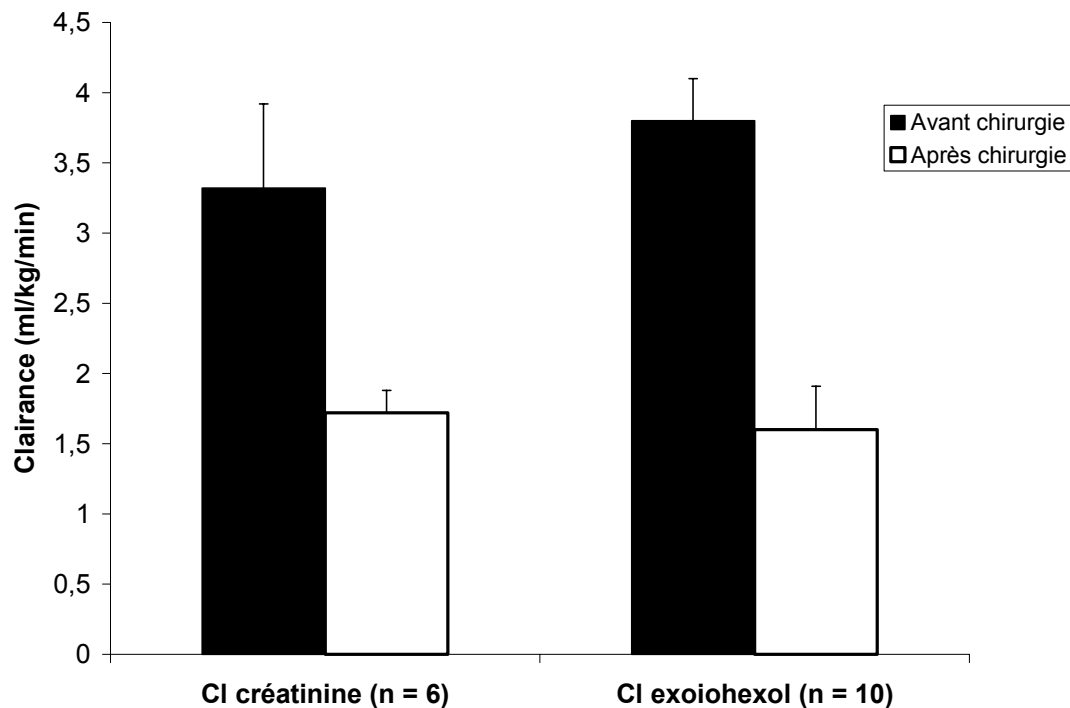


Fig.20: Représentation graphique des valeurs de clairance plasmatique de la créatinine et de l'exoiohexol (ml/kg/min) (moyenne ± ET) chez la population expérimentale avant et après la chirurgie rénale.

Une diminution significative ($P < 0.001$) du taux de filtration glomérulaire, déterminé par la clairance plasmatique de la créatinine (de 3.3 ± 0.16 ml/kg/min à 1.7 ± 0.31 ml/kg/min chez 6 chiens mâles) et par celle de l'exoiohexol (de 3.8 ± 0.6 ml/kg/min à 1.6 ± 0.3 ml/kg/min chez 10 chiens femelles) a été induite par la chirurgie rénale.

L'opération a ainsi entraîné une diminution moyenne de 54% du taux de filtration glomérulaire chez les chiens (les valeurs s'échelonnant de 35 à 68%).

V/ 3.1.2. Dosages de la créatinine plasmatique

Des dosages ponctuels de la créatininémie ont été réalisés avant et après la chirurgie chez les 16 chiens de la population expérimentale. La figure 21 représente l'évolution de ces concentrations plasmatiques.

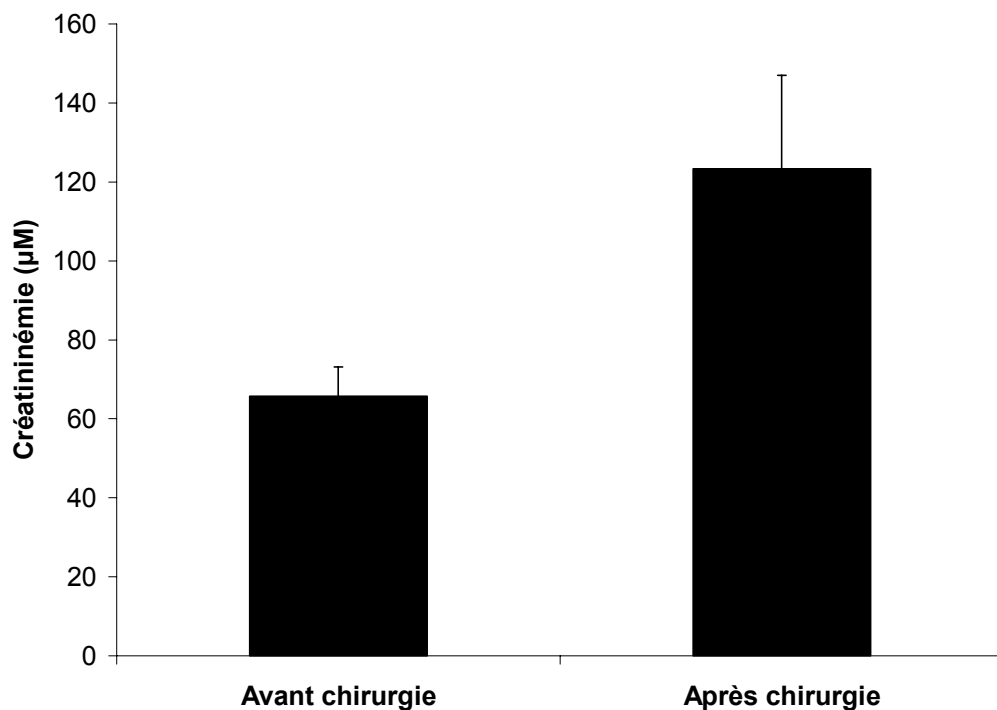


Fig. 21 : Représentation graphique des valeurs de créatininémie (µM) (moyenne ± ET) chez 16 chiens avant et après la chirurgie rénale.

La créatininémie moyenne avant la chirurgie était de 65.8 µM (± 7.43 , 49.0-75.0 µM). Quelques jours après l'opération, cette valeur était multipliée par un facteur de 1.9, ce qui représentait une créatininémie de 123.3 µM (± 23.66 , 87.0-182.0, $P < 0.001$). La plupart des valeurs se trouvait dans les valeurs usuelles (VU) de créatininémie chez le chien : VU (µM) = [44-133], ce qui confirmait le caractère subclinique de l'IR.

VI/ 3.2. Effets de l'insuffisance rénale sur les concentrations en PrPc plasmatique

Quatre dosages de PrPc plasmatique ont été réalisés au cours des années 2003 et 2004 sur la population de chiens insuffisants rénaux opérés en décembre 2002. Sur la population de chien contrôle, une mesure unique de la concentration en PrPc dans le plasma a été pratiquée, le même jour que le premier prélèvement des chiens expérimentaux (le 4 mars 2003). Cette mesure ponctuelle nous a permis de déterminer la concentration basale en PrPc plasmatique chez une population de chiens sains. Ces données sont présentées dans la figure 22.

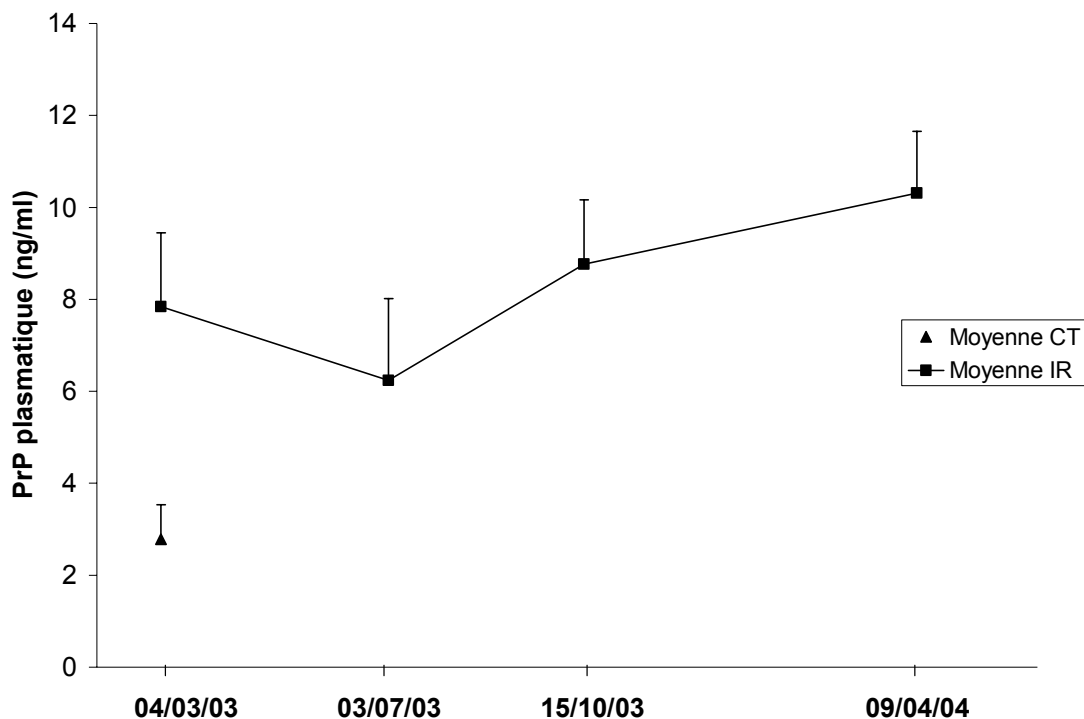


Fig. 22 : Evolution temporelle des concentrations en PrPc plasmatique (ng/ml) chez les 16 chiens insuffisants rénaux et valeur basale de cette concentration chez les chiens contrôles (moyenne \pm ET).

Chez la population de chiens contrôle, la valeur basale de la concentration en PrPc plasmatique était de 2.8 ng/ml (\pm 0.95, 1.6-4.6 ng/ml). Lors du premier prélèvement, cette concentration était de 7.8 ng/ml (\pm 1.61, 5.3-12.1 ng/ml, $P < 0.001$) chez les chiens insuffisants rénaux, ce qui constituait une multiplication de cette valeur par un facteur de 2.8. Par la suite, la concentration basale a été multipliée par 2.2 (3 juillet 2003), 3.1 (15 octobre 2003) et 3.7 (9 avril 2004), ce qui correspondait à des valeurs moyennes en PrPc plasmatique de 6.2 (\pm 1.78, 3.1-8.9 ng/ml), 8.8 (\pm 1.39, 5.6-10.3 ng/ml) et 10.3 ng/ml (\pm 1.34, 7.4-12.2 ng/ml), respectivement.

VI/ Expérience 3 : Effet d'une insuffisance rénale spontanée sur la concentration plasmatique de la protéine endogène PrPc chez le chien

VI/ 1. Objectif

Notre objectif était d'évaluer les conséquences d'une IR spontanée sur les concentrations plasmatiques en protéine endogène PrPc. Nous avons réalisé une étude rétrospective en prenant comme modèles d'étude des chiens chez lesquels une IR clinique spontanée avait été constatée. Nous avons considéré que ces chiens formaient un échantillon représentatif de la population canine française.

VI/ 2. Matériel et méthodes

VI/ 2.1. Animaux

L'expérience a été effectuée avec 22 chiens contrôles sains et 27 chiens insuffisants rénaux. Ces chiens étaient venus en consultation aux cliniques des petits animaux de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse au cours des années 2002, 2003 et 2004. Les deux populations de chiens étaient homogènes pour le sexe, l'âge et le poids. 19 races étaient représentées.

En moyenne, les 22 chiens contrôles étaient âgés de 8.3 ans (± 4.17) et pesaient 20.7 kg (± 11.78). On comptait 9 femelles (dont 1 était stérilisée) et 11 mâles (dont 1 était castré). Le sexe de deux animaux ne nous était pas connu. 40% de ces animaux avaient été traités pour des pathologies mineures n'ayant entraîné aucune altération de l'état général et aucun dysfonctionnement de la fonction rénale ; sur les 60% restants avait été réalisé un bilan préopératoire.

En moyenne, les 27 chiens insuffisants rénaux étaient âgés de 9.6 ans (± 5.11) et pesaient 19.3 kg (± 6.97). On comptait 10 femelles (dont 3 étaient stérilisées) et 18 mâles (dont 1 était castré). Pour ces chiens, le diagnostic d'IR avait d'abord été établi à partir des signes cliniques (polyurie, déshydratation, hypertension artérielle), et confirmé par l'augmentation de la créatinine (supérieure à 130 μ M).

VI/ 2.2. Récapitulatif : paramètres de population

	Nombre d'animaux	Ratio femelle/mâle	Age moyen en années (\pm écartype)	Poids moyen en kilos (\pm écartype)
Population contrôle	22	9/11	8.3 (± 4.17)	20.7 (± 11.78)
Population IR	27	5/9	9.6 (± 5.11)	19.3 (± 6.97)

VI/ 2.3. Protocole expérimental

Pour chaque chien venu en consultation à l'Ecole Vétérinaire, nous avons établi une fiche dans laquelle étaient indiqués : concernant le propriétaire, son nom, son adresse, son numéro de téléphone et le numéro de dossier client ; concernant l'animal, un numéro d'identification, son nom, sa

race, son sexe, sa date de naissance, son poids et son numéro de tatouage. La créatininémie réalisée au cours de la consultation par le laboratoire de biochimie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, sur une prise de sang à la veine jugulaire, a également été noté, ainsi que le diagnostic final établi à l'issue des différents examens.

La PrPc endogène a été dosée au cours de l'année 2005 dans les échantillons sanguins conservés congelés.

VI/ 2.4. Procédure expérimentale

VI/ 2.4.1. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins avaient été réalisés à l'aide d'un cathéter intravasculaire en regard de la veine jugulaire. Le sang avait été recueilli dans des tubes en verre ou dans des tubes en polypropylène contenant de l'héparine. Le sang avait été immédiatement mélangé par retournement et rapidement centrifugé, à 3000g pendant 10 min). Le plasma avait été réparti en fractions aliquotes de 0.5 ml dans des tubes Eppendorf® de 1.5 ml et immédiatement congelé à -20°C. Les tubes avaient été identifiés avec le numéro d'identification des animaux.

VI/ 2.4.2. Dosages

La créatinine plasmatique avait été dosée avec une technique enzymatique utilisant la créatininase et la sarcosine oxydase, sur support de réactifs secs Vitros (Ortho Clinical Diagnostics) (laboratoire de biochimie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse).

La PrPc plasmatique a été mesurée avec la même méthode que celle décrite au cours de la validation de méthodes (dosage par immunométrie). Le couple d'anticorps utilisé était le SAF 34 / 12F10.

VI/ 2.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel Systat ® (version 10.0, SPSS Inc, Chicago, IL). La moyenne et l'écart-type ont été calculés pour les différentes variables. L'effet de l'insuffisance rénale spontanée sur les concentrations plasmatiques en créatinine et en PrPc a été analysé par un test t de Student. La relation entre les concentrations en PrPc et le statut rénal (déterminé par les concentrations plasmatiques en créatinine) a été déterminée par régression linéaire ($y = a \ln(x) + b$).

VI/ 3. Résultats

VI/ 3.1. Evolution des concentrations plasmatiques en créatinine chez des chiens insuffisants rénaux

Des mesures ponctuelles de créatininémie ont été réalisées chez la population de chiens contrôles et chez la population de chiens insuffisants rénaux, afin d'explorer la fonction rénale.

Tous les chiens contrôles se trouvaient dans les valeurs usuelles de créatininémie. La valeur moyenne de la créatininémie dans cette population était de 82.9 μM (± 15.64 , 56.3-120.3 μM).

En revanche, à l'exception d'un animal présentant une créatininémie de 130.6 μM , les chiens insuffisants rénaux avaient des valeurs supérieures aux valeurs usuelles, ce qui confirmait le caractère clinique de leur insuffisance rénale. La valeur moyenne de créatininémie dans cette population était de 429.0 μM (± 277.72 , 130.6-1131.1).

VI/ 3.2. Evaluation des conséquences d'une IR sur les concentrations plasmatiques en protéine endogène PrPc

Les chiens contrôles se trouvaient dans des valeurs de concentration plasmatique en PrPc comprises entre 2.6 et 25.1 ng/ml, avec une valeur moyenne de 8.0 ng/ml (± 4.67).

Les chiens insuffisants rénaux avaient des valeurs comprises entre 8.1 et 50.9 ng/ml. La valeur moyenne de la concentration plasmatique en PrPc dans cette population était de 24.4 μM (± 12.52), ce qui correspondait à une multiplication de la valeur basale estimée chez la population contrôle par un facteur de 3.1 ($P < 0.001$).

Il existait donc un effet significatif du statut rénal des animaux (sains ou insuffisants rénaux) sur les concentrations plasmatiques en PrPc et en créatinine.

Afin de déterminer la part des variations des concentrations plasmatiques en PrPc expliquées réellement par l'insuffisance rénale, la corrélation entre les valeurs de ces concentrations avec celles de la créatininémie, marqueur du fonctionnement du rein, a été évaluée. Les résultats sont présentés dans la figure 23.

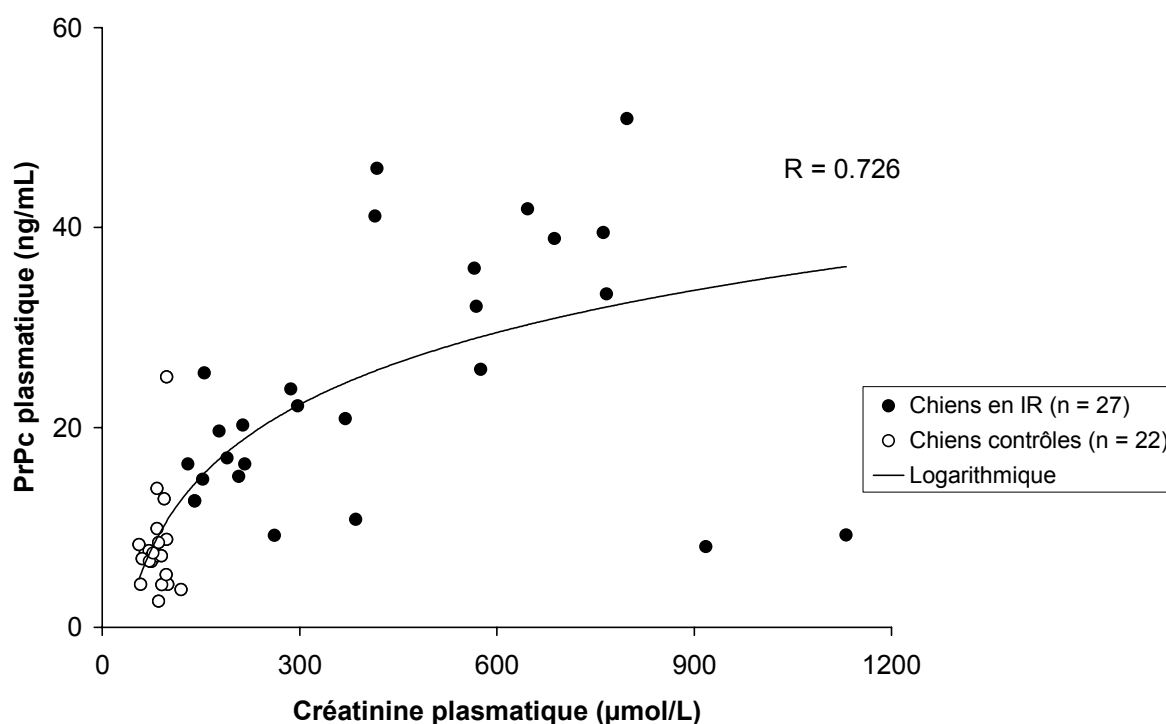


Fig. 23 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs de créatininémie ($\mu\text{mol/L}$) et celles de la concentration plasmatique en PrPc (ng/ml) chez les 2 populations de chiens (contrôles et insuffisants rénaux).

Nous avons obtenu un coefficient de corrélation de 0.726 chez la population de chiens insuffisants rénaux, ce qui signifiait que 72,6% des variations des concentrations plasmatiques en PrPc étaient attribuables au statut rénal des animaux.

VII/ Discussion

Dans cette étude, nous avons déterminé le rôle du rein dans la clairance plasmatique de la PrP, et nous avons évalué l'effet de l'insuffisance rénale sur les concentrations plasmatiques en PrPc.

Nous avons tout d'abord évalué, chez la brebis, l'effet d'une néphrectomie bilatérale sur la disposition de la protéine du prion recombinante administrée par voie

IV chez trois brebis anesthésiées. Nous avons montré que la néphrectomie divise par 2.4 (± 0.21) la clairance de la PrPrec. Par ailleurs, le temps moyen de résidence (MRT) de la protéine augmente nettement. En revanche, le volume de distribution à l'équilibre (VSS) est peu modifié par l'ablation des reins. Enfin, le coefficient d'extraction rénale de la PrPrec est de 58.4% (± 4.9).

Nous avons alors vérifié que l'évolution des paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec est seulement due à la néphrectomie, et non en partie liée à l'anesthésie. Nous avons donc évalué l'effet de l'anesthésie sur le devenir de la PrPrec chez une brebis. Nous avons obtenu des valeurs de clairance pratiquement identiques, que la brebis soit anesthésiée ou non (2.1 ml/kg/min et 2.2 ml/kg/min, $P < 0.01$). Ainsi, l'anesthésie ne modifie pas la clairance de la PrPrec. En revanche, nous avons constaté que l'anesthésie induit une augmentation du VSS (45.0 ml/kg/min vs. 81.4 ml/kg/min) et du MRT (20.1 ml/kg vs. 39.1 ml/kg). L'effet de l'anesthésie sur le VSS et le MRT peut s'expliquer par la persistance de la PrPrec à des concentrations très faibles (proches de la limite de quantification) pendant une période beaucoup plus longue que chez la brebis non anesthésiée (cf. figure 18).

Bien que l'anesthésie n'ait pas d'effet sur les variations des paramètres pharmacocinétiques de la PrPrec avant et après néphrectomie, nous avons cependant remarqué que les valeurs nominales de clairance chez la brebis anesthésiée pendant la période contrôle (B4) sont plus faibles que celles mesurées chez les deux brebis non anesthésiées (B1 et B2), aussi bien avant qu'après l'opération (0.8 ml/kg/min vs. 2.1 et 1.6 ml/kg/min avant la néphrectomie, 0.3 ml/kg/min vs. 0.9 et 0.7 ml/kg/min après la néphrectomie). Etant donné le petit nombre d'animaux utilisé dans notre expérience, il est difficile de déterminer s'il existe un lien entre l'anesthésie et les faibles valeurs de clairance observées chez la brebis anesthésiée pendant la période contrôle.

A partir d'un modèle de néphrectomie bilatérale chez la brebis anesthésiée, nous avons ainsi montré que le rein contribue à 58,4% (Er) à l'élimination de la protéine du prion après son administration par voie IV. Cet organe joue donc un rôle majeur dans l'élimination de la protéine du prion.

Cependant, nous n'avons pas mis en évidence la présence de la PrPrec dans les urines pendant les 12 heures qui ont suivi son administration, peut-être par un manque de sensibilité de la méthode de dosage. Toutefois, l'utilisation du couple d'anticorps 11C6-BAR 224 a permis de détecter la présence d'une forme tronquée de la PrP dans certains échantillons d'urines (communication personnelle du Dr Gayraud). Rappelons par ailleurs qu'une isoforme de la PrP résistante à la digestion par les protéases a été mise en évidence dans des urines de hamsters atteints de

tremblante subclinique, ainsi que chez celles de bovins touchés par l'ESB et de patients souffrant du nvMCJ (Shaked, 2001).

D'autres organes participent à la clairance plasmatique de la PrPrec dans une moindre mesure. D'après les résultats présentés par S. Ithurrealde concernant les mécanismes de clairance de la PrPrec (Ithurrealde, 2004), il n'existe pas d'effet de premier passage pulmonaire dans l'élimination de la PrPrec.

En revanche, bien que cela n'est pas pu être formellement démontré, le foie participerait à la clairance de certaines souches de prions, ce qui serait compatible avec les connaissances actuelles concernant la pharmacocinétique des glycoprotéines. Le système réticulo-endothélial est particulièrement impliqué dans le métabolisme et l'élimination de ces molécules, et il est fortement dépendant de la glycosylation des protéines. La PrP porte une ou deux chaînes glycosylées riches en mannose, glucosamine, fucose et acide sialique (Safar, 1990). Or, les glycoprotéines qui portent des résidus terminaux comme le mannose, le galactose, la N-acétyl-glucosamine et le fucose disparaissent rapidement de la circulation, car elles sont reconnues par des récepteurs spécifiques au niveau hépatique et réticulo-endothélial. La présence d'acides sialiques aux extrémités des chaînes glucidiques protège les glycoprotéines de ces interactions cataboliques. Ils contribuent à la diminution de la clairance et, par conséquent, à l'allongement des demi-vies d'élimination. Les données relatives à la biochimie et à la structure de la PrP sont donc essentielles pour déterminer ses mécanismes de clairance.

La protéine du prion recombinante ne constitue qu'un modèle pour les protéines pathogènes. Synthétisée par un procaryote, elle ne subit aucune maturation post-traductionnelle. En revanche, la PrPsc connaît plusieurs modifications après sa synthèse sur les ribosomes : l'addition d'une ancre GPI, la formation d'un pont disulfure, la glycosylation des protéines sur deux acides aminés spécifiques, et une protéolyse partielle au cours de l'endocytose et du recyclage des protéines (Stahl, 1991). Les différences biochimiques observées entre la PrPrec et la PrPsc pourraient conduire à des différences dans le métabolisme et l'élimination de ces protéines par le rein.

En revanche, sur ce point, notre modèle d'insuffisance rénale du chien se révèle être plus intéressant, puisque nous évaluons les conséquences d'une atteinte

du rein sur l'élimination de la protéine endogène PrPc. Or, la PrPc et la PrPsc présentent les mêmes modifications post-traductionnelles : aucune différence biochimique n'a été rapportée entre les deux protéines (Stahl, 1991).

Dans une deuxième partie, à partir d'un modèle d'insuffisance rénale induite et d'un modèle d'insuffisance rénale spontanée chez le chien, nous avons donc évalué l'incidence de l'insuffisance rénale sur les concentrations plasmatiques de la protéine endogène PrPc.

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec une population de chiens chez lesquels une insuffisance rénale modérée et contrôlée a été chirurgicalement induite. Ce modèle expérimental nous a permis de maîtriser différents facteurs de variations qui auraient pu constituer des biais importants : la race, l'âge, le sexe et le poids des animaux ; les conditions de prélèvement du sang ; l'intensité de l'insuffisance rénale induite. Grâce à la maîtrise de ces facteurs, nous avons donc pu déterminer l'impact réel d'une insuffisance rénale sur la concentration plasmatique de la protéine endogène PrPc chez le chien.

Les clairances plasmatiques de la créatinine et de l'exoiohexol ont indiqué que la chirurgie rénale avait entraîné une diminution de 54% de la capacité fonctionnelle du rein chez les animaux opérés, ce que confirme la multiplication des valeurs de créatininémie par un facteur de 1.9. Ainsi, en début d'évolution, l'insuffisance rénale est modérée et subclinique.

A partir de ce modèle d'insuffisance rénale expérimentale du chien, nous avons montré que les concentrations plasmatiques spontanées en PrPc sont multipliées par 2.8 chez les chiens insuffisants rénaux par rapport à celles de chiens témoins normaux. Ce résultat obtenu chez le chien suggère que la PrPc, comme la PrPrec, est éliminée par les reins et que la PrPrec constitue donc un bon modèle pour étudier le devenir de la protéine du prion.

L'insuffisance rénale pourrait donc constituer un facteur de susceptibilité physiopathologique aux maladies à prions. En effet, en entraînant une réduction de la clairance plasmatique de la PrPc, elle favoriserait la transconformation de la PrPc à partir de la PrPsc. Cette transconformation pourrait également être exacerbée par une plus lente élimination des protéines infectieuses néoformées.

Nous avons complété notre travail en utilisant un modèle d'insuffisance rénale spontanée du chien. Pour cela, nous avons réalisé une étude épidémiologique rétrospective en prenant comme modèles des chiens chez lesquels une insuffisance rénale clinique spontanée avait été constatée.

L'atteinte rénale des chiens avait été confirmée par un dosage de créatininémie : tous les animaux avaient des valeurs supérieures aux valeurs usuelles.

Nous avons montré que les concentrations plasmatiques spontanées en PrPc sont multipliées par 3.1 chez les chiens insuffisants rénaux par rapport à celles de chiens témoins normaux. Nous

avons par ailleurs établi que 72.6% des variations des concentrations plasmatiques en PrPc sont réellement attribuables à l'insuffisance rénale.

Ces résultats confirment ceux obtenus à partir de notre modèle expérimental de chiens insuffisants rénaux et de notre modèle de néphrectomie bilatérale chez la brebis. Le rôle majeur des reins dans l'élimination de la PrP^{sc} et de la PrP^c indique que l'insuffisance rénale, en favorisant la persistance de la PrP dans le compartiment sanguin, pourrait augmenter le risque infectieux.

La clairance rénale des protéines est essentiellement dépendante de leur taille moléculaire. Compte tenu du diamètre des pores glomérulaires, seules les molécules dont la taille moléculaire est inférieure à 55 kDa peuvent être filtrées au niveau glomérulaire ; la PrP passe donc cette barrière. Ensuite, de façon générale, les protéines sont plus ou moins réabsorbées au niveau tubulaire, puis fragmentées par les systèmes enzymatiques des cellules tubulaires. Il s'ensuit une réabsorption tubulaire de peptides et d'acides aminés provenant de la dégradation de la protéine. Lorsque les molécules ont des tailles moléculaires inférieures à 55 kDa, ce qui est le cas pour la protéine du prion, elles sont préférentiellement éliminées par le rein ; pour des tailles supérieures, l'élimination est principalement extrarénale.

Les processus cellulaires concernant l'élimination de la PrP au niveau rénal ne sont pas connus. Cependant, on peut penser que ces mécanismes peuvent varier en fonction du polymorphisme biochimique de la PrP, ce qui induirait des clairances différentes en fonction des souches infectieuses mises en jeu. Ainsi, en raison d'une exposition plus ou moins prolongée de l'organisme à la PrP, la biologie cellulaire particulière de chaque isoforme contribuerait à la susceptibilité ou à la résistance au prion.

L'étude des mécanismes de clairance plasmatique de la PrP amène donc à discuter de l'origine et de la nature biochimique de la PrPc circulante, qui est essentielle à la multiplication de la protéine infectieuse. Soulignons que la PrP^{sc} elle-même a été identifiée dans le plasma sanguin (Brown, 1999).

La PrPc est principalement exprimée au niveau du système nerveux. Cependant, elle est aussi retrouvée à des niveaux d'expression plus faibles au niveau de nombreux tissus, et en particulier du sang. Chez l'Homme, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes expriment la PrPc ; cependant, seulement une partie de la PrPc sanguine est associée aux cellules, la partie restante étant présente dans la fraction plasmatique (MacGregor, 1999). Les cellules endothéliales, qui présentent également la PrPc à leur surface, sont une des sources majeures de cette forme plasmatique. En effet, les scientifiques estiment qu'elles synthétisent et libèrent de façon constitutive la PrPc dans le sang, soit sous forme soluble, soit sous une forme liée à des microparticules membranaires libérées après apoptose cellulaire (Simak, 2002 ; Starke, 2002). En revanche, les leucocytes, les érythrocytes et les plaquettes ne contribuent pas de façon significative à la formation de la PrPc plasmatique (Starke, 2002).

L'endothélium vasculaire est l'un des premiers tissus que rencontre le prion après son entrée dans l'organisme par les voies orale ou intraveineuse. Cependant, le rôle des cellules endothéliales dans la transmission et la pathogénie des ESST est encore mal connu. On sait toutefois que ces

cellules sont capables d'accumuler la PrPsc après l'infection, à la différence des plaquettes, des érythrocytes et des cellules de la moelle osseuse (Simak, 2002).

La PrPc est une molécule complexe qui se présente sous de nombreuses isoformes. Cette hétérogénéité est liée à une différence de glycosylation (protéines non-, mono- ou biglycosylées) et à l'existence de formes tronquées. La composition en isoformes est spécifique des tissus (Moudjou, 2001). Dans le cerveau humain par exemple, il existe une forme entière et deux formes tronquées, ces dernières résultant d'un clivage à des sites distincts au niveau de l'extrémité - NH₂. Ces différentes formes présentent des chaînes glycosylées en nombre et de structure variables (Pan, 2002). Par ailleurs, une forme tronquée à l'extrémité C-terminale a été détectée dans le sperme chez l'Homme et les bovins (Shaked, 1999). On peut supposer de même que la PrPc circulante existe sous différentes isoformes, entières ou tronquées. Or, une équipe de chercheurs a récemment montré que la biologie cellulaire de la PrP ovine varie avec son polymorphisme naturel, et que les interactions de la protéine avec la machinerie cellulaire présentent des particularités en fonction du variant mis en jeu (Sabuncu, 2005). Les mécanismes cellulaires de clairance rénale de la PrP pourraient donc être spécifiques de l'isoforme, ce qui induirait des capacités d'élimination variables. Ainsi, la présence plus ou moins prolongée de la PrPc dans le sang contribuerait à la sensibilité ou à la résistance aux maladies à prions, en augmentant ou en diminuant la probabilité de survenue de la transconformation en PrPsc. Par ailleurs, l'hétérogénéité de la PrPc contribuerait à l'existence des différentes souches infectieuses, car les formes tronquées pourraient elles aussi subir une transconformation en PrPsc.

Nos résultats expérimentaux sont compatibles avec l'hypothèse d'une métabolisation de la PrP au niveau rénal. En effet, après l'administration intraveineuse de la PrPrec aux brebis, une forme tronquée de la PrP a été détectée dans certains échantillons d'urines (communication personnelle du Dr Gayraud). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'existence de cette forme tronquée. Après filtration glomérulaire et réabsorption tubulaire, la PrPrec a été métabolisée dans les cellules tubulaires puis excrétée dans les urines. Ou alors la PrPrec soluble dans les urines a été partiellement dégradée par une protéase urinaire après filtration. Nous ne pouvons cependant pas écarter une troisième hypothèse : nous avons mis en évidence une isoforme tronquée de la PrPc endogène, et non un métabolite de la PrPrec administrée.

L'insuffisance rénale pourrait augmenter la sensibilité d'un individu à l'infection par le prion. D'autres facteurs, en intervenant sur le niveau d'exposition de l'organisme à la PrP, seraient capables d'accroître cette susceptibilité. Ainsi, la souche pathogène mise en jeu influencerait la disposition de la protéine. En effet, Rezaei et son équipe (Rezaei, 2000) ont montré que la protéine PrP ovine recombinante dont le gène est muté en position 136 (variant V₁₃₆Q₁₇₁) et qui est associée à une forte sensibilité à la tremblante est intrinsèquement plus stable que le variant « A₁₃₆R₁₇₁ » qui est liée au caractère résistant à la maladie. La stabilité supérieure du variant « V₁₃₆Q₁₇₁ » pourrait être à l'origine d'une réduction in vivo de la clairance de la protéine. Les données thermodynamiques confirment la stabilité plus grande du variant VRQ par rapport au variant ARR : sa conformation spatiale est plus compacte, et sa résistance à la digestion protéique est légèrement supérieure (Sabuncu, 2005). Cependant, dans l'étude de Sabuncu, les 2 variants de la PrP présentent les mêmes temps de demi-

vie en culture cellulaire. Selon cet auteur, ce n'est donc pas une élimination plus rapide du variant ARR qui expliquerait la résistance plus grande à l'infection liée à ce génotype.

Les résultats expérimentaux obtenus par S. Ithurrealde (Ithurrealde, 2004) démontrent en revanche que, après son administration directe par voie sanguine chez la brebis, le variant A₁₃₆R₁₇₁ de la PrP est plus vite éliminable que le variant V₁₃₆Q₁₇₁ de la protéine, sa clairance étant en moyenne deux fois supérieure. Pour un variant de la protéine, le génotype de la brebis receveuse n'a quant à lui aucune influence sur la vitesse d'élimination de la PrP.

CONCLUSION

Notre projet s'inscrit dans l'analyse du risque de la transmission iatrogène à l'Homme de l'agent du nvMCJ par la transmission de sang. A partir d'un modèle de néphrectomie bilatérale chez la brebis et d'un modèle d'insuffisance rénale chez le chien, nous avons confirmé que le rein est le principal organe émonctoire impliqué dans la clairance plasmatique de la protéine du prion. Or, plus l'organisme est capable d'éliminer rapidement la PrPsc infectieuse qui circule dans le sang, moins il est exposé à l'agent pathogène. De plus, la transconformation de la PrPc en PrPsc pourrait être facilitée ou exacerbée par une plus lente élimination de la protéine du prion cellulaire et des protéines infectieuses néoformées. En influençant le niveau d'exposition à la protéine du prion, l'insuffisance rénale pourrait augmenter la sensibilité d'un individu à l'infection, constituant donc un facteur de susceptibilité physiopathologique aux maladies à prions. Ces résultats sont cohérents avec l'observation chez l'homme d'une augmentation très importante des concentrations plasmatiques en PrPc (facteur 10) en cas d'insuffisance rénale grave (Starke, 2002).

Notons que nos résultats, obtenus par l'étude des mécanismes de clairance de la PrPrec et de la PrPc, prendront toute leur signification lorsqu'ils auront été confirmés *in fine* par l'évaluation du processus d'élimination de la protéine pathologique ou PrPsc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS. (Page consultée le 18 septembre 2006). Site de l'Afssa, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.afssa.fr>

AGUZZI, A., HEPPNER, F.L., HEIKENWALDER, M., *et al.*

Immune system and peripheral nerves in propagation prions to CNS.

Br Med Bull., 2003, **66**, 141-159.

ANDREOLETTI, O., BERTHON, P., MARC, D., *et al.*

Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie.

J Gen Virol., 2000, **81**, 3115-3126.

ANDREOLETTI, O., LACROUX, C., CHABERT, A., *et al.*

PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission.

J Gen Virol., 2002, **83**, 2607-2616.

ANDREOLETTI, O., SIMON, S., LACROUX, C., *et al.*

PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie.

Nat Med., 2004, **6**, 591-593.

BALDAUF, E., BEEKES, M., DIRINGER, H.

Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord.

J Gen Virol., 1997, **78**, 1187-1197.

BENESTAD, S.L., SARRADIN, P., THU, B., *et al.*

Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98.

Vet Rec., 2003, **153**, 202-208.

BLÄTTLER, T., BRANDNER, S., RAEBER, A.J., *et al.*

PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain.

Nature, 1997, **389**, 69-73.

BONS, N., MESTRE-FRANCES, N., GUIRAUD, I., *et al.*

Prion immunoreactivity in brain, tonsil, gastrointestinal epithelial cells, and blood and lymph vessels in lemurian zoo primates with spongiform encephalopathy.

CR Acad Sci III, 1997, **320**, 971-979.

BONS, N., LEHMANN, S., MESTRE-FRANCES, N., *et al.*

Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*.

Transfusion, 2002, **42**, 5, 513-516.

BRANDNER, S.

CNS pathogenesis of prion diseases.

Br Med Bull., 2003, **66**, 131-139.

BRANDNER, S., ISENMANN, S., RAEBER, A., *et al.*

Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity.

Nature, 1996, **379**, 339-343.

BROWN, P.

Transfusion medicine and spongiform encephalopathy.

Transfusion, 2001, **41**, 4, 433-436.

BROWN, P., CERVENAKOVA, L., DIRINGER, H.

Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease.

J Lab Clin Med., 2001, **137**, 1, 5-13.

BROWN, P., CERVENAKOVA, L., MCSHANE, L.M., *et al.*

Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans.

Transfusion, 1999, **39**, 11-12, 1169-1178.

BROWN, P., ROHWER, R.G., DUNSTAN, B.C., MACAULEY, C., *et al.*

The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy.

Transfusion, 1998, **38**, 810-816.

BROWN, K.L., STEWART, K., RITCHIE, D.L., *et al.*

Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells.

Nat Med., 1999, **5**, 1308-1312.

BRUCE, M.E., MCCONNELL, I., WILL, R.G., *et al.*

Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues.

Lancet, 2001, **358**, 208-209.

BRUCE, M.E., WILL, R.G., IRONSIDE, J.W., *et al.*

Transmission to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent.

Nature, 1997, **389**, 488-501.

BÜELER, H., AGUZZI, A., SAILER, A., *et al.*

Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.

Cell, 1993, **73**, 1339-1347.

BURTHEM, J., ROBERTS, D.J.

The pathophysiology of variant Creutzfeldt-Jakob disease: the hypotheses behind concerns for blood components and products.

Br J Haematol., 2003, **122**, 1, 3-9.

CASALONE, C., ZANUSSO, G., ACUTIS P., *et al.*

Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy : molecular similarities with sCJD.

Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**, 3065-3070.

CASTILLA, J., SAA, P., SOTO, C.

Detection of prions in blood.

Nat Med., 2005, **11**, 9, 982-985.

CHAMBERLAND, M.E.

Emerging infectious agents: do they pose a risk to the safety of transfusion blood and blood products?

Clin Infect Dis., 2002, **34**, 6, 797-805.

COLLINGE, J., SIDLE, K.C., MEADS, J., *et al.*

Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant CJD.

Nature, 1996, **383**, 685-690.

COLLINS, S.J., LAWSON, V.A., MASTERS, C.L.

Transmissible spongiform encephalopathies.

Lancet, 2004, **363**, 9402, 51-61.

CUILLE, J., CHELLE, P.L.

La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable ?

C R Hebd Seances Acad Sci., 1936, **203**, 1552-1554.

DESLYS, J.P.

Prions et risques pour la transfusion sanguine : le point en 2003.

Transfus Clin Biol., 2003, **10**, 3, 113-125.

DETWILER, L.A., BAYLIS, M.

The epidemiology of scrapie.

Rev Sci Tech Off Int Epiz., 2003, **22**, 1, 121-143.

DICKINSON, A.G.

Scrapie in sheep and goats.

Front Biol., 1976, **44**, 209-241.

ELOIT, M., ADJOU, K., COULPIER, M., *et al.*

BSE agent signatures in a goat.

Vet Rec., 2005, **156**, 16, 523-524. Erratum in: *Vet Rec.*, 2005, **156**, 19, 620.

ELSEN, J.M., AMIGUES, Y., SCHELCHER, F., *et al.*

Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov.

Arch Virol., 1999, **144**, 3, 431-445.

FOSTER, J.D., BRUCE, M., McCONNELL, I., *et al.*

Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep.

Vet Rec., 1996, **138**, 546-548.

FOSTER, J.D., HOPE, J., FRASER, H.

Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats.

Vet Rec., 1993, **133**, 339-341.

FOSTER, J.D., PARNHAM, D., CHONG, A., *et al.*

Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats.

Vet Rec., 2001, **148**, 165-171.

GAJDUSEK, D.C.

Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru.

Science, 1977, **197**, 4307, 943-959.

GLATZEL, M., ABELA, E., MAISSEN, M., *et al.*

Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

N Engl J Med, 2003, **349**, 1812-1820.

GRAY, F.

Apoptose neuronale au cours des maladies à prions.

Bull Acad Natl Med., 1999, **183**, 2, 305-321.

GUILLET, J.P.

ESB. Evolution de l'épizootie en France.

La Semaine Vétérinaire, 2006, **1227**, 28.

HAIK, S., FAUCHEUX, B.A., SAZDOVITCH, V., *et al.*

The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease.

Nat Med., 2003, **9**, 1121-1123.

HARRIS, D.A.

Trafficking, turnover and membrane topology of PrP.

Br Med Bull., 2003, **66**, 71-85.

HERZOG, C., SALES, N., ETCHEGARY, N., CHARBONNIER, A., *et al.*

Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection.

Lancet, 2004, **7**, 363, 422-428.

HILL, A.F., BUTTERWORTH, R.J., JOINER, S., *et al.*

Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples.

Lancet, 1999, **353**, 183-189.

HILL, A.F., DESBRUSLAIS, M., JOINER, S., *et al.*

The same prion strain causes vCJD and BSE.

Nature, 1997, **389**, 448-450.

HILL, A.F., JOINER, S., LINEHAN, J., *et al.*

Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species.

Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**, 18, 10248-10253.

HORNEY, D., ARCHIBALD, J.

Nephrectomy in cattle and sheep.

J Am Vet Med Assoc., 1961, **138**, 551-552.

HOPE, J., WOOD, S.C.E.R., BIRKETT, C.R., *et al.*

Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641.

J Gen Virol., 1999, **80**, 1-4.

HOPKIN, M.

Fears grow as blood stocks pass on prions undetected.

Nature, 2004, **430**, 7001, 712.

HOUSTON, F., FOSTER, J.D., CHONG, A., *et al.*

Transmission of BSE by blood transfusion in sheep.

Lancet, 2000, **356**, 999-1000.

HUANG, F.P., FARQUHAR, C.F., MABBOTT, N.A., *et al.*

Migrating intestinal dendritic cells transport PrPsc from the gut.

J Gen Virol., 2002, **83**, 267-271.

HUNTER, N., FOSTER, J., CHONG, A., *et al.*

Transmission of prion diseases by blood transfusion.

J Gen Virol., 2002, **83**, 11, 2897-2905.

IRONSIDE, J., BISHOP, M.T., CONNOLLY, K., *et al.*

Variant Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein genotype analysis of positive appendix tissue samples from a retrospective prevalence study.

Br Med J., 2006, **332**, 1186-1188.

ITHURRALDE, S.

Analyse de la disposition de la protéine du prion recombinante ovine administrée par voie intraveineuse chez la brebis.

Th. Med. Vet. : Toulouse: 2004-TOU 3, 4036.

JEFFREY, M., GOODSIR, C.M., HOLLIMAN, A., *et al.*

Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice.

Vet Rec., 1998, **142**, 534-537.

JEFFREY, M., RYDER, S., MARTIN, S., *et al.*

Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE).

I. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera.

J Comp Pathol., 2001, **124**, 280-289.

KLEIN, M.A., *et al.*

PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion.

Nat Med., 1998, **4**, 1429-1433.

LASMEZAS, C.I.

The transmissible spongiform encephalopathies.

Rev Sci Tech Off Int Epiz., 2003, **22**, 1, 23-36.

LASMEZAS, C.I., DESLYS, J.P., DEMAIMAY, R., *et al.*

BSE transmission to macaques.

Nature, 1996, **381**, 743-744.

LASMEZAS, C.I., DESLYS, J.P., ROBAIN, O., *et al.*

Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein.

Science, 1997, **275**, 402-405.

LASMEZAS, C.I., FOURNIER, J.G., NOUVEL, V., *et al.*

Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health.

Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**, 7, 4142-4147.

LEBLANC, P.P., BELANGER, P.M.

Elimination.

In: LEBLANC, P.P., AIACHE, J.M., BESNER, J.G., *et al.*

Traité de biopharmacie et pharmacocinétique.

Paris : Vigot, 1997, 179-191.

LEGNAME, G., BASKAKOV, I.V., NGUYEN, H.O., *et al.*

Synthetic mammalian prions.

Science, 2004, **305**, 5684, 673-676.

LEMAIRE-VIEILLE, C., SCHULZE, T., PODEVIN-DIMSTER, V., *et al.*

Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovin prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice.

Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**, 5422-5427.

LLEWELYN, C.A., HEWITT, P.E., KNIGHT, R.S., *et al.*

Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion.

Lancet, 2004, **363**, 9407, 417-421.

MA, J., WOLLMANN, R., LINDQUIST, S.

Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol.

Science, 2002, **298**, 1781-1785.

MABBOTT, N.A., BRUCE, M.E.

The immunobiology of TSE diseases.

J Gen Virol., 2001, **82**, 2307-2318.

MAIGNIEN, T., LASZEMAS, C.I., BERINGUE, V., *et al.*

Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents.

J Gen Virol., 1999, **80**, 3035-3042.

MANUELIDIS, E.E., GORGACZ, E.J., MANUELIDIS, L., *et al.*

Viremia in experimental Creutzfeldt-Jakob disease.

Science, 1978, **200**, 1069-1071.

McBRIDE, P.A., SCHULZ-SCHAEFFER, W.J., DONALDSON, M., *et al.*

Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves.

J Virol., 2001, **75**, 19, 9320-9327.

McGREGOR, I., HOPE, J., BARNARD, G., *et al.*

Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components.

Vox sanguinis, 1999, **77**, 88-96.

MONTRASIO, F., FRIGG, R., GLATZEL, M., *et al.*

Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells.

Science, 2000, **288**, 1257-1259.

MOUDJOU, M., FROBERT, Y., GRASSI, J., *et al.*

Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures.

J Gen Virol., 2001, **82**, 2017-2024.

NORMILE, D.

A new form of mad cow?

Science, 2004, **303**, 5662, 1285.

PAN, T., LI, R., WONG, B-S., *et al.*

Heterogeneity of normal prion protein in two-dimensional immunoblot: presence of various glycosylated and truncated forms.

J Neurochem., 2002, **81**, 1092-1101.

PATTISON, I.H., HOARE, M.N., JEBBETT, J.N., *et al.*

Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep.

Veterinary record, 1974, **90**, 465-468.

PEDEN, A.H., HEAD, M.W., RITCHIE, D.L., *et al.* (IRONSIDE)

Preclinical vCJD after blood transfusion in a PNRP codon 129 heterozygous patient.

Lancet, 2004, **364**, 9433, 527-529.

PRINCE, M.J., BAILEY, J.A., BARROWMAN, P.R., *et al.*

Bovine spongiform encephalopathy.

Rev Sci Tech Off Int Epiz., 2003, **22**, 1, 37-60.

PRUSINER, S.B.

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.

Science, 1982, **216**, 136-144.

PRUSINER, S.B.

Prions.

Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**, 13363-13383.

PRUSINER, S.B., GROTH, D., SERBAN, A., *et al.*

Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies.

Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90**, 10608-10612.

RACE, R., JENNY, A., SUTTON, D., *et al.*

Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis.

J Infect Dis., 1998, **178**, 949-953.

REZAEI, H., MARC, D., CHOISET, Y., *et al.*

High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility.

Eur J Biochem., 2000, **267**, 2833-2839.

RYDER, S., DEXTER, G., BELLWORTHY, S., *et al.*

Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy.

Res Vet Sci., 2004, **76**, 211-217.

SABUNCU, E., PAQUET, S., CHAPUIS, J., *et al.*

Prion proteins from susceptible and resistant sheep exhibit some distinct cell biological features.

Biochem Biophys Res Commun., 2005, **337**, 791-798.

SHAKED, G.M., SHAKED, Y., KARIV-INBAL, Z., *et al.*

A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases.

J Biol Chem., 2001, **34**, 31479-31482.

SAFAR, J., WANG, W., PADGETT, M.P.

Molecular mass, biochemical composition, and physicochemical behaviour of the infectious form of the scrapie precursor protein monomer.

Proc Natl Acad Sci USA, 1990, **87**, 6373-6377.

SAFAR, J., WILLE, H., ITRI, V., *et al.*

Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations.

Nat Med., 1998, **4**, 10, 1157-1163.

SCHLOMCHIK, M.J., RADEBOLD, K., DUCLOS, N., *et al.*

Neuroinvasion by a Creutzfeldt-Jakob disease agent in the absence of B cells and follicular dendritic cells.

Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**, 16, 9289-9294.

SCOTT, M.R., WILL, R., IRONSIDE, J., *et al.*

Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans.

Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**, 26, 15137-15142.

SHAKED, Y., ROSENMAN, H., TALMOR, G., *et al.*

A C-terminal-truncated PrP isoform is present in mature sperm.

J Biol Chem., 1999, **274**, 32153-32158.

SIMAK, J., HOLADA, K., D'AGNILLO, F., *et al.*

Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma.

Transfusion, 2002, **42**, 334-342.

SOLFOROSI, L., CRIADO, J.R., MCGAVERN, D.B., *et al.*

Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo.

Science, 2004, **303**, 1514-1516.

STAHL, N., PRUSINER, S.B.

Prions and prion proteins.

FASEB J., 1991, **5**, 2799-2808.

STARKE, R., DRUMMOND, O., MACGREGOR, I., *et al.*

The expression of prion protein by endothelial cells: a source of the plasma form of prion protein?

Br J Haematol., 2002, **119**, 863-873.

WATSON, A.D.J., LEFEBVRE, H.P., CONCORDET, D., *et al.*

Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy.

J Vet Intern Med., 2002, **16**, 22-33.

WELLS, G.A., HAWKINS, S.A.C., GREEN, R.B., *et al.*

Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update.

Vet Rec., 1998, **142**, 103-106.

WILESMITH, J.B., RYAN, J.B.M., ATKINSON, M.J., *et al.*

Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin.

Vet Rec., 1991, **128**, 199-203.

WILL, R.G., IRONSIDE, J.W., ZEIDLER, M., *et al.*

A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.

Lancet, 1996, **347**, 921-925.

WRATHALL, A.E.

Risks of transmitting scrapie and BSE by semen and embryos.

Rev Sci Tech Off Int Epiz., 1997, **16**, 240-264.

Toulouse, 2006

NOM : BALME

PRENOM : EMMANUELLE

TITRE : CONTRIBUTION A L'EVALUATION DE FACTEUR DE RISQUE DE TRANSMISSION D'UNE ESST LORS DE TRANSFUSION SANGUINE.

RESUME :

Le projet s'inscrit dans l'analyse du risque de la transmission iatrogène à l'Homme de l'agent du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob par la transfusion de sang. Dans ce cadre, nous avons déterminé le rôle du rein dans la clairance plasmatique de la protéine du prion (PrP), et nous avons évalué l'effet de l'insuffisance rénale (IR) sur les concentrations plasmatiques en PrP cellulaire (PrPc). A partir d'un modèle de néphrectomie bilatérale chez la brebis, nous avons montré que le rein contribue à 50% à la clairance de la PrP recombinante après son administration par voie intraveineuse. De plus, nous avons observé que l'IR chez le chien est associée à une augmentation des concentrations plasmatiques en PrPc. Le rein joue donc un rôle majeur dans l'élimination de la PrPc. L'IR des patients transfusés, en maintenant des concentrations plasmatiques élevées en PrPc, substrat de la protéine du prion pathologique (PrPsc) lors du processus infectieux, pourrait exacerber ce processus et constituer ainsi un facteur de susceptibilité physiopathologique aux maladies à prions.

MOTS-CLES : PRION / REIN / CLAIRANCE / CHIEN / MOUTON / FACTEUR DE RISQUE / TRANSFUSION SANGUINE

TITLE: CONTRIBUTION TO ESTIMATION OF A RISK FACTOR OF TSE TRANSMISSION FOLLOWING A BLOOD TRANSFUSION.

ABSTRACT :

This project aimed at estimating the risk of iatrogenic transmission to human of the agent of the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. We determined the role of kidney in plasma clearance of the prion protein (PrP) after its intravenous administration, and we evaluated the effect of renal insufficiency on cellular PrP (PrPc) plasma concentrations. From a model of bilateral nephrectomy in the ewe, we showed that kidney contributes to 50% of the clearance of PrP after its intravenous administration. Moreover, we observed that renal insufficiency in the dog is associated with an increase in the plasma concentrations of PrPc. Consequently, the kidney plays a major part in the elimination of PrPc. Renal insufficiency of transfused patients, by maintaining high plasma concentrations of PrPc, substrate of the pathological prion protein (PrPsc) during the infectious process, could exacerbate this process and thus constitute a physiopathological factor of susceptibility to TSE.

KEY WORDS : PRION / KIDNEY / CLEARANCE / DOG / SHEEP / RISK FACTOR / BLOOD TRANSFUSION